

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Serologische Untersuchungen zu Vorkommen und
Differenzierung von Antikörpern gegen Rickettsien der Spotted
Fever Group bei Hunden aus Deutschland

von Miriam Jessica Wächter
aus München

München 2015

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von PD Dr. Cornelia Silaghi

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: PD Dr. Cornelia Silaghi

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter
Prof. Dr. Andrea Fischer
Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger
Prof. Dr. Cornelia A. Deeg

Tag der Promotion: 18. Juli 2015

Die vorliegende Arbeit wurde nach § 6 Abs. 2 der Promotionsordnung für die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München als kumulative Dissertation gestaltet.

Für meine Familie

meine Eltern Elisabeth und Werner, meine Schwester Kristine und meinen Freund Marcel

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	1
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	3
I. EINLEITUNG	5
II. LITERATURÜBERSICHT	8
1. Spotted Fever Group Rickettsiae.....	8
1.1. Systematik	8
1.2. Morphologie	9
1.3. Lebenszyklus, Vektoren und Reservoir	9
1.4. Prävalenzen von <i>Rickettsia helvetica</i> , <i>R. raoultii</i> , <i>R. slovaca</i> , <i>R. monacensis</i> , <i>R. massiliae</i> und <i>R. felis</i> in Zecken in Europa und Deutschland	11
1.5. Prävalenzen von Reservoirtieren	14
1.6. Seroprävalenzen bei Mensch und Tier	15
1.7. Klinik.....	18
1.8. Diagnostik	21
1.8.1. Zellkultur.....	22
1.8.2. Molekularbiologische Methoden	22
1.8.3. Serologie.....	23
III. MATERIAL UND METHODEN	25
1. Probensammlung und –material	25
1.1. Ein- und Ausschlusskriterien	25
1.2. Minimaldaten und zusätzliche Daten	26
2. Laboruntersuchungen.....	27
2.1. Blut- und Buffy Coat-Ausstriche	27
2.2. ELISA.....	27
2.3. Mikro-Immunfluoreszenz.....	29
2.3.1. Herstellung der micro-IFA Slides	29
2.3.2. Durchführung der Immunfluoreszenztests	31
2.3.3. Screening der Proben	32

2.3.4.	Austitration.....	32
3.	Statistik.....	32
IV.	ERGEBNISSE	34
1.	Probenmaterial	34
2.	Publikationen.....	34
2.1.	Publikation 1	35
2.2	Publikation 2	45
V.	DISKUSSION	69
VI.	SCHLUSSFOLGERUNG	74
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	75
VIII.	SUMMARY.....	77
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	79
X.	ABBILDUNGEN	92
XI.	TABELLEN	93
XII.	ANHANG	94
1.	Material	94
1.1.	Geräte	94
1.2.	Kits, Chemikalien.....	95
1.3.	Puffer, Lösungen	96
1.4.	Antikörper, Kontrollseren	97
2.	Dokumente	98
XIV.	DANKSAGUNG	100

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Ampere
Abb.	Abbildung
AG	ancestral group
BE	Berlin
bp	Basenpaar
BY	Bayern
BW	Baden-Württemberg
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
°C	Grad Celsius
CFT	Komplementbindungsreaktion (engl. Complement fixation test)
DEBONEL	<i>Dermacentor</i> borne necrosis erythema lymphadenopathy
DNA	Desoxyrubinukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
etc.	et cetera (und so weiter)
evtl.	eventuell
FKS	fötales Kälberserum
ggf.	gegebenenfalls
gltA	Citrat Synthase Gen
HEL	human erythroleukemia cell line
H ₂ O	Wasser
IFA	Immunfluoreszenz-Antikörper-Test (engl. Immunofluorescence assay)
Ig	Immunglobulin
mA	Milliampere
MEL	Murine erythroleukemia
MEM	Mimimal essential medium
micro-IFA	Mikro- Immunfluoreszenz-Antikörper-Test
min	Minute
mm	Millimeter
MRC	Medical Research Council
MSF	Mittelmeerfleckfieber (engl. Mediterranean Spotted Fever)
NEAA	Non-essential amino acid

NI	Niedersachsen
nm	Nanometer
omp	Oberflächenprotein (engl. outer membrane protein)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction)
qPCR	quantitative PCR
RMSF	Rocky Mountain Fleckfieber (engl. Rocky Mountain Spotted Fever)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rotations per minute)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SFG	Zecken-Fleckfiebergruppe (engl. Spotted Fever Group)
SN	Sachsen
SL	Saarland
spp.	Spezies (Mehrzahl)
STG	<i>Tsutsugamushi</i> -Fieber-Gruppe (engl. Scrub Typhus Group)
Süddtl.	Süddeutschland
TG	epidemische Fleckfiebergruppe (engl. Typhus Group)
TIBOLA	tick-borne lymphadenopathy
TRG	transitional group
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
NRW	Nordrhein-Westfalen
µl	Mikroliter
XTC	<i>Xenopus laevis</i> tissue culture
z.B.	zum Beispiel

I. EINLEITUNG

Vektorübertragene Erkrankungen waren in der Vergangenheit und sind bis heute von großer Bedeutung bei Mensch und Hund (Heyman et al., 2010; Shaw et al., 2001). Im Zusammenhang mit vektorübertragenen Erkrankungen kann der Hund zwei unterschiedliche Rollen einnehmen: Eine kommt ihm als Sentineltier zu. Sie wurde schon für zeckenübertragene Erkrankungen wie der Lyme Borreliose, dem Mediterranean Spotted Fever (MSF) und dem Rocky Mountain Spotted Fever (RMSF) beschrieben (McQuiston et al., 2011; Rand et al., 1991; Tesouro et al., 1998). Die zweite Rolle ist seine mögliche Reservoirfunktion. In einem Reservoirwirt persistiert ein Krankheitserreger über einen langen Zeitraum und kann dann wieder über einen Vektor an den nächsten Wirt weitergegeben werden. Der Hund wird für mehrere vektorübertragene Pathogene, wie z. B. *Leishmania infantum* und *Anaplasma platys* als Reservoir diskutiert (Podaliri Vulpiani et al., 2011; Torina et al., 2008). Die Rolle des Hundes bei Rickettsiosen steht mittlerweile auch im Fokus der wissenschaftlichen Diskussion. Rickettsiosen werden durch Bakterien der Gattung *Rickettsia* ausgelöst und durch Arthropoden übertragen. Sie sind gleichzeitig sehr alte und sehr neue vektorübertragene Erkrankungen. Namensgebend war der Pathologe Howard Taylor Ricketts (1871 - 1910), der ab 1906 in Montana Untersuchungen zum von *R. rickettsii* ausgelösten RMSF durchführte. Große medizinische Bedeutung erlangten sie während der beiden Weltkriege, da aufgrund von großen Menschenansammlungen und schlechten hygienischen Bedingungen an der Front, in Schützengräben und unter Kriegsgefangenen eine Übertragung durch Vektoren leichter möglich war. Danach gab es nur noch vereinzelt Ausbrüche des gefürchteten, durch *R. prowazekii* verursachten klassischen Fleckfiebers. Aufgrund des Rückgangs der Erkrankungsfälle wurden von staatlicher Seite nur noch wenig Gelder für die Forschung zur Verfügung gestellt (Fischer, 2012). In den letzten 30 Jahren wurde allerdings ein Großteil der heute bekannten Rickettsienarten beschrieben und daraufhin die Forschung wieder intensiviert (Parola et al., 2013; Raoult and Roux, 1997). Deswegen spricht man von den Rickettsiosen als “re-emerging infectious diseases” (Walker and Ismail, 2008). Auch in Europa wurden im letzten Jahrzehnt neue Rickettsienarten wie z.B. *R. monacensis* in Deutschland und *R. hoogstraalii* in Kroatien beschrieben (Duh et al., 2010; Parola et al., 2005; Parola et al., 2013;

Simser et al., 2002).

Bei Rickettsieninfektionen, die eine Zecke mit breitem Wirtsspektrum als Vektor haben, könnten Hunde als Sentineltiere dienen (Shaw et al., 2001). Da Hunde im Allgemeinen häufiger Kontakt mit Zecken haben als Menschen, könnten die Seroprävalenzraten bei Hunden höher sein als beim Menschen. Damit stellen sie einen guten Indikator für die geographische Ausbreitung der Rickettsien dar (Feng et al., 1979). Tesouro et al. (1998) zeigten, dass Hunde gegen *R. conorii* persistierende Antikörpertiter entwickeln können und somit als Sentineltier für diese Rickettsienart geeignet sind. Levin et al. (2012) zeigten, dass Hunde als Reservoir für *R. conorii* in Frage kommen, denn selbst ohne nachweisbare Rickettsämie im Blut war die experimentelle Übertragung derselbigen auf eine naive Zecke möglich. Ein bereits vorhandener Antikörpertiter gegen Rickettsien der SFG bei Hunden kann bei einer Neuinfektion die Ausbreitung der Rickettsien im Körper verhindern und damit die Reservoirkompetenz des Hundes deutlich senken. Die Übertragung mittels cofeeding ist aber genauso effektiv wie bei naiven Hunden. Bedenkt man den häufigen Kontakt der Hunde mit infizierten Zecken wird durch den Übertragungsweg des cofeeding die Herabsetzung der Reservoirkompetenz wieder ausgeglichen (Levin et al., 2014).

Hunde könnten auch für Rickettsienarten in Deutschland eine Sentinelfunktion haben, ein Reservoir darstellen und so dazu beitragen, die geographische Ausbreitung und Prävalenz der vorkommenden Rickettsienarten besser einzuschätzen. Dies würde ihre Rolle in der Epidemiologie der humanen Rickettsiosen deutlich hervorheben. Serologische Kreuzreaktionen, eine kurze Rickettsämie und unspezifische Krankheitsbilder gestalten es aber oft schwierig, eine Infektion bei Mensch und Hund sicher und schnell zu diagnostizieren.

Daher waren die Ziele dieser Studie:

- (i) die Seroprävalenzraten mit Rickettsienantikörpern in Hunden in Deutschland mittels Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) und Immunfluoreszenz-Antikörper-Test (IFA) zu bestimmen,
- (ii) die Rickettsienart, die für die Antikörperantwort ursächlich verantwortlich ist mittels eines neuen Mikro-Immunfluoreszenz-Antikörper-Test (micro-IFA) zu differenzieren,

(iii) die geographische Verteilung der verschiedenen Rickettsienarten auszuwerten und

(iv) die serologischen Testsysteme ELISA und IFA hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität zu vergleichen.

Die Ergebnisse dieser Studie sollen damit einen Beitrag zur Rickettsienforschung in Deutschland leisten und grundlegende Kenntnisse zum Vorkommen der Rickettsienarten sowie der Rolle des Hundes als mögliches Reservoir- und Sentineltier liefern. Zusätzlich soll mit dem neuen micro-IFA die Differenzierung von Antikörperantworten vereinfacht werden und damit auch eine Basis für einen Test in der Humanmedizin gelegt werden. Breitschwerdt et al. (1987) führte eine Studie zur Differenzierung von Antikörperantworten mit den in Amerika vorkommenden Rickettsienarten *R. rickettsii*, *R. rhipicephali*, *R. montana* und *R. bellii* durch; mit den in Deutschland vorkommenden Spezies ist bisher noch nichts vergleichbares durchgeführt worden. Deswegen soll mit dieser Studie ein Beitrag zur Validierung und Vereinfachung der serologischen Diagnostik von SFG Rickettsien in Deutschland geliefert werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Spotted Fever Group Rickettsiae

1.1. Systematik

Bei der Ordnung *Rickettsiales* handelt es sich um Bakterien, die der Abteilung der Proteobakterien und der Klasse der α -Proteobakterien zugeordnet sind.

Im letzten Jahrzehnt wurde eine umfangreiche Reorganisation der gesamten Ordnung *Rickettsiales* vorgenommen. Vorher war diese auf der Basis von morphologischen Merkmalen, der serologischen Kreuzreaktivität und dem von den Rickettsien infizierten Zelltyp strukturiert (Rikihisa, 1991).

Die neuere Organisation basiert auf molekularen Methoden, mit denen Ähnlichkeiten im 16S rRNA Gen untersucht werden. Damit wird eine phylogenetische Zuordnung möglich (Dumler et al., 2001). Die Ordnung *Rickettsiales* besteht nun aus den Familien *Rickettsiaceae* und *Anaplasmataceae*. Die Familie der *Anaplasmataceae* besteht aus den Gattungen *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Wolbachia*, *Aegyptianella*, *Neorickettsia*, *Candidatus Neoehrlichia* und *Candidatus Xenohalictis* (Friedman et al., 2000; Kawahara et al., 2004). Die Familie der *Rickettsiaceae* wird in die zwei Gattungen *Rickettsia* und *Orientia* unterteilt, wobei man bei der Gattung *Rickettsia* nach serologischen und klinischen Gesichtspunkten zwei große Gruppen unterscheidet: die „Spotted Fever Group“ und die „Typhus Group“ (Abb. 1).

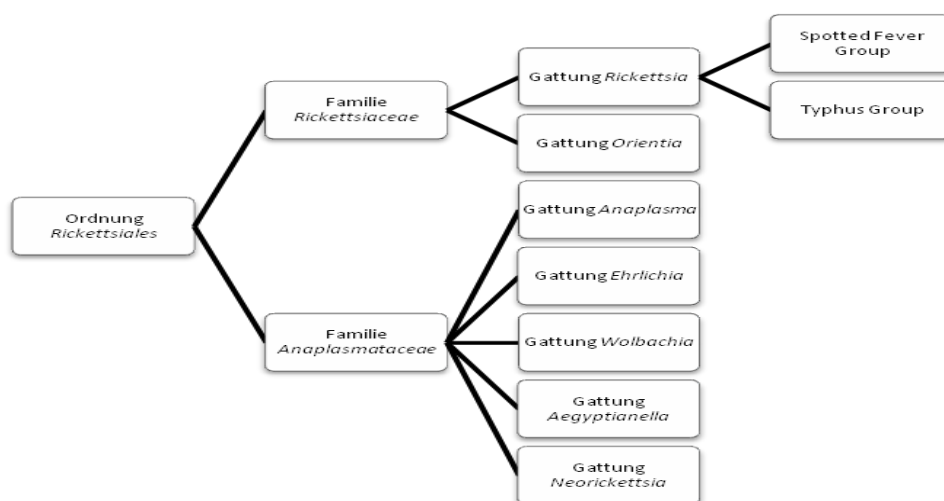


Abb. 1: Systematik der Ordnung Rickettsiales

Henry Pinkerton beschrieb 1936 bei den Rickettsien drei verschiedene Untergruppen, die auf phänotypischen Merkmalen basierten: die Typhus Group (TG), die Scrub Typhus Group (STG) und die Spotted Fever Group (SFG) (Blanco and Oteo, 2006; Roux and Raoult, 2000). Die TG bestand aus den drei Spezies *Rickettsia typhi*, *R. prowazekii* und *R. canadensis*, die STG enthielt lediglich die Spezies *R. tsutsugamushi* und der SFG wurden alle restlichen Rickettsienspezies zugeordnet (Roux and Raoult, 2000).

Seit einer Umorganisation aufgrund der genetischen Struktur der einzelnen Rickettsien wurde die Teilung in drei Gruppen aufgehoben; die STG wurde dem Genus *Orientia* zugeordnet, somit teilen sich die Rickettsien in die zwei Gruppen TG mit *R. typhi* und *R. prowazekii* sowie die SFG mit momentan etwas mehr als 30 verschiedenen Spezies (Dobler and Pfeffer, 2012; Roux and Raoult, 2000).

Neuere molekularbiologische Untersuchungen schlagen die Unterteilung in vier Gruppen vor: die TG, die SFG, die ancestral group (AG) und the transitional group (TRG) (Gillespie et al., 2007). Der AG werden *R. bellii* und *R. canadensis* zugeordnet, die TRG besteht aus *R. felis* (Gillespie et al., 2007; Vitorino et al., 2007).

1.2. Morphologie

Rickettsien sind gram-negative, obligat intrazellulär lebende Bakterien. Sie werden als kokkoide Stäbchen mit einer Größe von 0,3-0,5x1,0-2,0µm beschrieben, die sich mit der Giemsa-Färbung anfärben lassen (Parola et al., 2005).

1.3. Lebenszyklus, Vektoren und Reservoir

Rickettsien der SFG werden mit Ausnahme von *R. felis* und *R. akari*, ausschließlich durch Zecken übertragen (Dumler et al., 2001; Raoult and Roux, 1997). Zecken gehören zur Klasse der Spinnentiere (*Arachnida*), Unterklasse der Milben (*Acari*), wobei drei Familien unterschieden werden: Schildzecken (*Ixodidae*), Lederzecken (*Argasidae*) und die *Nuttalliellidae*, mit der einzigen Art *Nuttallia namaqua* (Deplazes et al., 2012). Dagegen ist der Hauptvektor von *R. felis* ein Insekt, der Katzenfloh *Ctenocephalides felis felis*. Allerdings wurde *R. felis* auch bereits aus der Schildzecke *Ixodes ricinus* isoliert. Ob *R. felis* auch *I. ricinus* als Vektor nutzen kann, muss noch untersucht werden (Dobler and Wölfel, 2009). Der Vektor von *R. akari* ist die Hausmausmilbe (*Liponyssoides*

sanguineus), das dadurch ausgelöste Krankheitsbild der Rickettsialpocken wird hauptsächlich in den urbanen Gegenden der USA beschrieben (Denison et al., 2014).

SFG Rickettsien vermehren sich ausschließlich intrazellulär durch Querteilung. Die Übertragung auf einen Vertebraten erfolgt durch blutsaugende Arthropoden während des Saugaktes. Im Vertebraten werden die Bakterien durch induzierte Phagozytose meist in Endothelzellen kleinerer Gefäße aufgenommen und vermehren sich dort sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern, den sie mithilfe des wirtszelleigenen Aktins erreichen können (Elfving et al., 2012).

Um sich selbst zu infizieren, müssen die Zecken an einem infizierten Wirtstier saugen. Ob eine Bakteriämie des Wirtstiers für die Infektion einer naiven Zecke vorhanden sein muss wird kontrovers diskutiert (Levin et al., 2012; Rehacek, 1989) (Abb. 2). Die systemische Infektion der Zecke mit Rickettsien entwickelt sich über die Mitteldarmzellen in die Körperhöhle, Hämolymphe und die Speicheldrüsen, sowie schließlich in die Eierstöcke (Socolovschi et al., 2009).

Als Übertragungswege innerhalb der Zecken werden für Rickettsien die transstadiale und die transovarielle Übertragung, sowie die Übertragung beim Paarungsakt und durch Cofeeding beschrieben (Hayes et al., 1980; Philip and Parker, 1933; Raoult and Roux, 1997; Socolovschi et al., 2009) (Abb. 2).

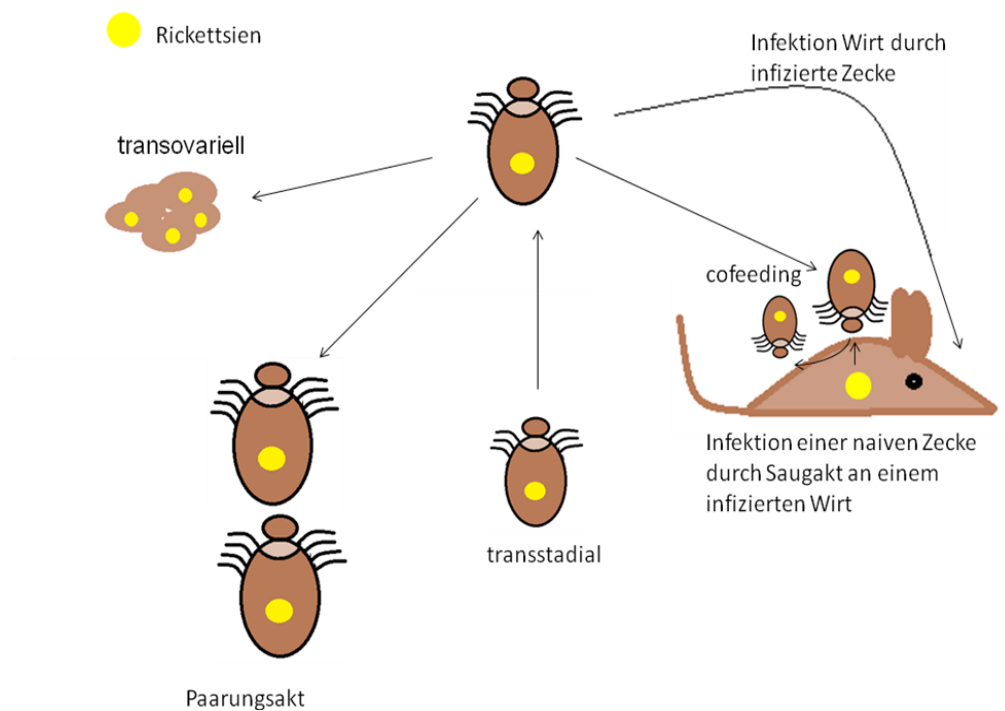


Abb. 2: Übertragungswege der Rickettsien innerhalb der Zecken und von einem Wirt

Zecken werden als das Hauptreservoir für Rickettsien angesehen, die Rolle von Säugetieren (u.a. Hund) und Vögeln ist noch umstritten und Gegenstand der aktuellen Forschung (Daiter, 1960; Giroud et al., 1959; Hornok et al., 2014; Levin et al., 2012; Levin et al., 2014; Sprong et al., 2009).

1.4. Prävalenzen von *Rickettsia helvetica*, *R. raoultii*, *R. slovaca*, *R. monacensis*, *R. massiliae* und *R. felis* in Zecken in Europa und Deutschland

Deutschland

Rickettsien der SFG sind bei in Deutschland heimischen Zecken weit verbreitet (Dobler und Wölfel, 2009), (Tab. 1). DNA verschiedener Rickettsien wurde aus Schildzecken der Arten *I. ricinus*, *I. hexagonus*, *Dermacentor marginales* und *D. reticulatus* isoliert (Dobler and Wölfel, 2009; Eshoo et al., 2014; Hartelt et al., 2004; May and Strube, 2014; Overzier et al., 2013b; Pichon et al., 2006; Pluta et al., 2010; Schicht et al., 2012; Schorn et al., 2011; Schreiber et al., 2014; Silaghi et al., 2008; Silaghi et al., 2011; Speck et al., 2013; Tappe and Strube, 2013; Wölfel et al., 2006). In Mitteleuropa und somit auch in Deutschland stellt *I. ricinus* mit ca. 90% der Zeckenpopulation die häufigste Art dar (Deplazes et al.,

2012; Rufli and Mumcuoglu, 1981).

Die am häufigsten vorkommende Rickettsienart mit den höchsten Prävalenzen ist *R. helvetica* mit 3,5-52,2%. Sie wurde aus Zecken der Gattung *I. ricinus* aus Standorten in ganz Deutschland isoliert (Tabelle 1).

Rickettsia raoultii und *R. slovaca* wurden ausschließlich aus den Zeckenarten *D. reticulatus* bzw. *D. marginatus* isoliert. Die Zeckenart *D. marginatus* wurde entlang des Mains (Aschaffenburg) und im Saarland entlang der Saar, die Zeckenart *D. reticulatus* im Rheintal (Lörrach), im Saarland entlang der Saar, in südlichen Bayern nahe München und in einem renaturierten Braunkohlegebiet in Sachsen untersucht. Die Prävalenzen für *R. raoultii* bzw. *R. slovaca* lagen zwischen 30,0-56,7% bzw. 0,8-13,3% (Pluta et al., 2009; Schreiber et al., 2014; Silaghi et al., 2011).

DNA von *R. monacensis* wurde nur in niedrigen Prävalenzen von 0,2 bis 0,6% aus *I. ricinus* isoliert. Alle Fundorte der positiv getesteten Zecken lagen, mit Ausnahme von zwei positiven Zecken aus dem Raum Hannover, im Süden Deutschlands (Dobler et al., 2009; Eshoo et al., 2014; Overzier et al., 2013b; Schicht et al., 2012; Schorn et al., 2011; Schreiber et al., 2014; Silaghi et al., 2008).

Rickettsia massiliae wurde bisher nur in einer Zecke der Art *I. ricinus* in Ostbayern, *R. felis* in einer *I. ricinus* in Nordostbayern entdeckt (Dobler and Wölfel, 2009).

Overzier et al. (2013b) untersuchten einen möglichen Zusammenhang zwischen der Infektionsrate von Zecken mit SFG Rickettsien und dem Habitat. Die Infektionsraten waren in Weideland und Wald signifikant höher als in urbanen Standorten.

Tabelle 1: Spotted Fever Group Rickettsiae in Deutschland - Prävalenzzahlen in Zecken in Abhängigkeit der geographischen Lage

Rickettsienspezies	Zeckenspezies	% pos	Anzahl getestete Zecken	Region	Referenz
<i>R. helvetica</i>	<i>I. ricinus</i>	5,6-13,3%	1187	BW	(Hartelt et al., 2004)
		12,0%	2141	BY	(Wölfel et al., 2006)
		4,8%	2861	BY	(Silaghi et al., 2008)
		6,0%	4459	BY	(Schorn et al., 2011)
		14,2%	127	BE	(Pichon et al., 2006)
		3,5-6,2%	3591	Stüddtl.	(Dobler and Wölfel, 2009)
		32,9%	1089	NI	(Schicht et al., 2012)
		>13,4%	1702	BY/ SL/ SN	(Silaghi et al., 2011)
		8,5%	2186	BY	(Overzier et al., 2013b)
		52,5%	1400	Hamburg	(May and Strube, 2014)
		26,2%	2100	Hannover	(Tappe and Strube, 2013)
		61,0%	205	Berlin	(Schreiber et al., 2014)
		16,8%	226	Stüddtl.	(Eshoo et al., 2014)
		17,4%	471	Hooksiel/ Hamburg/ Berlin/ Beinwald/ Steinfeld/ Esslingen	(Speck et al., 2013)
<i>R. monacensis</i>	<i>I. hexagonus</i>	37,4%	151	Berlin	(Schreiber et al., 2014)
		6,5%	462	Hooksiel/ Hamburg/ Berlin/ Beinwald/ Steinfeld/ Esslingen	(Speck et al., 2013)
		0,5%	2861	BY	(Silaghi et al., 2008)
		0,6%	3591	BY	(Dobler and Wölfel, 2009)
		0,4%	4459	BY	(Schorn et al., 2011)
		0,4%	1089	NI	(Schicht et al., 2012)
		0,2%	2186	BY	(Overzier et al., 2013b)
		0,9%	226	Stüddtl.	(Eshoo et al., 2014)
		4,4%	151	Berlin	(Schreiber et al., 2014)
		0,4%	1450	BY/ NRW	(Dobler and Wölfel, 2009)
		1,7%	57	östliches BY	(Dobler and Wölfel, 2009)
		30,0%	666	BW	(Pluta et al., 2010)
		56,7%	1359	BY/ SL/ SN	(Silaghi et al., 2011)
		39,3%	272	Berlin	(Schreiber et al., 2014)
<i>R. slovaca</i>	<i>D. spp.</i>	2,3%	151	Berlin	(Schreiber et al., 2014)
		0,8%	666	BY	(Pluta et al., 2010)
		13,3%	15	BY/ SL/ SN	(Silaghi et al., 2011)

BE: Berlin, BY: Bayern, BW: Baden-Württemberg, NRW: Nordrheinwestfalen, SL: Saarland, SN: Sachsen, NI: Niedersachsen

Europa

Die sechs aus deutschen Zecken isolierten SFG Rickettsienarten (*R. helvetica*, *R. raoultii*, *R. slovaca*, *R. monacensis*, *R. felis*, *R. massiliae*) sind auch im restlichen Europa weit verbreitet (Parola et al., 2013). DNA von *R. helvetica* wurde mindestens in 24 europäischen Staaten (z.B. Dänemark, Italien, Portugal, Schweden, Bulgarien) aus Zecken der Gattungen *I. ricinus*, *I. hexagonus*, *I. arboricola* und *D. reticulatus* isoliert (Parola et al., 2013). Abhängig von Jahreszeit, Entwicklungsstadium und Art der Zecke schwanken Prävalenzen zwischen 8,0 und 44,0% (Parola et al., 2013). Funde von *R. monacensis*-DNA in *I. ricinus* stammen aus Spanien, Portugal, Italien, Türkei, Schweiz, Luxemburg, Schweden, Slowakei, Albanien, Ungarn, Bulgarien, Moldawien, Ukraine, Serbien, Russland, Belarus und Polen mit Prävalenzen von 1,0 bis 57,0% (Parola et al., 2013). DNA von *R. slovaca* und *R. raoultii* wurde in zahlreichen europäischen Ländern aus den Zeckengattungen *D. reticulatus* und *D. marginatus* mit Prävalenzraten von 1,7-58,5% isoliert (Parola et al., 2013). *Rickettsia massiliae* wurde bisher aus *Rhipicephalus sanguineus*, *R. turanicus*, *R. pusillus*, *R. bursa* und *I. ricinus* in acht verschiedenen Ländern (Italien, Spanien, Griechenland, Serbien, Frankreich, Zypern, Polen, Argentinien) isoliert; Prävalenzen schwankten zwischen 2,0 und 92,0% (Parola et al., 2013). *Rickettsia felis*-DNA wurde in Europa außer in Deutschland auch in Kroatien aus Zecken (*Haemophysalis* spp.) isoliert; Prävalenzen lagen bei 20-26% (Duh et al., 2006; Reif and Macaluso, 2009).

1.5. Prävalenzen von Reservoirtieren

Haydon et al. (2002) definiert ein Reservoir als ein oder mehrere Populationen aus dem Tier- oder Pflanzenreich, sowie spezielle Umweltbedingungen, in denen ein Pathogen dauerhaft überleben und von dem es auf die definierte Zielpopulation übertragen werden kann .

Tierarten wie z.B. Vögel, Mäuse und Hunde werde als Reservoirtiere für Rickettsien der SFG diskutiert (Hornok et al., 2014; Levin et al., 2012; Schex et al., 2011). Levin et al. (2012) untersuchten in einer Infektionsstudie mit *R. conorii* die Reservoirkompetenz des Hundes. Nicht infizierte Hunde konnten sich durch den Stich *R. conorii* positiver *Rhipicephalus sanguineus* infizieren; ebenso war es möglich, dass naive Zecken durch den Kontakt mit einem infizierten Hund den Erreger aufnehmen konnten.

Schex et al. (2011) untersuchten kleine Säugetierarten wie die Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*), die Waldmaus (*Apodemus sylvaticus*) und die Rötelmaus (*Myodes glareolus*) mittels PCR auf Rickettsien der SFG. Die Prävalenzen lagen bei 5,2-11,6%; es konnten die Rickettsienspezies *R. felis* und *R. helvetica* identifiziert werden. Overzier et al. (2013a) untersuchten Milz-, Blut- und Hautproben von Rehwild mittels PCR auf Rickettsien der SFG, konnten aber keine Rickettsien-DNA nachweisen.

Damit erscheinen Hunde und Kleinsäuger als mögliche Reservoirwirte, für die Reservoirfunktion von Rehwild konnten keine Anhaltspunkte gefunden werden (Levin et al., 2012; Overzier et al., 2013a; Schex et al., 2011).

1.6. Seroprävalenzen bei Mensch und Tier

Seroprävalenzstudien über die Antikörperbildung gegen SFG Rickettsien beim Menschen, bei Hunden und anderen Tieren gibt es in Deutschland und Europa nur wenige (Tabelle 2).

Seroprävalenzen beim Menschen

Die Seroprävalenzen in humanen Studien mittels Immunofluorescence assay (IFA) und Complement fixation test (CFT) reichen von 1,2-55,0% (Tab. 2). Auffallend ist ein Anstieg der Seroprävalenz über die Jahre. Im Jahr 1977 lag die Seroprävalenz noch bei 1,2%, im Jahr 2012 lag sie bei bis zu 65,0% (Schmatz et al., 1977; Wölfel et al., unpublished). Die untersuchten Personengruppen haben einen Einfluss auf die gefundene Seroprävalenz. Bei Blutspendern lagen die Prävalenzen nur bei 1,2-9,5%, während sie bei den Risikogruppen Jäger und Waldarbeiter bei 9,1% bzw. 11,0-55,0% lagen (Jansen et al., 2008; Schmatz et al., 1977; Sonnleitner et al., 2013; Wölfel et al., unpublished).

Seroprävalenzen bei Tieren

Die Seroprävalenzen bei Hunden liegen je nach Rickettsienspezies zwischen 5,7-89,5% (Tab. 2). Hier macht es einen Unterschied, ob es sich um ein Gebiet handelte, in dem auch bei Menschen schon mehrere Krankheitsfälle der untersuchten Rickettsiose aufgetreten waren. In diesen Gebieten zeigten sich sehr hohe Prävalenzen. Zum Beispiel in einem Gebiet in Arizona, in dem humane Fälle von Rocky Mountain Spotted Fever (RMSF) aufgetreten waren, hatten 70% der 97 Hunde einen positiven ImmunglobulinG (IgG)-Antikörpertiter gegen *R. rickettsii* (Demma et al., 2006). Harrus et al. (2007) untersuchte die Seren von 85

Hunden aus zwei Dörfern in Israel, in denen auch humane Fälle von Mediterranean Spotted Fever (MSF) aufgetreten waren. Dort zeigten 81% der Hunde einen positiven IgG-Antikörpertiter auf *R. conorii*.

Bei Katzen wurden Seroprävalenzen von 1,9-27,8%, bei Wildtieren 27,2% und bei Farmtieren Seroprävalenzen von 11,4% festgestellt (Lledo et al., 2014; Segura et al., 2014). Keine Antikörper wurden bei den Tierarten Schaf, Wolf, Marder, Osterschermas, Hermelin, Kleinwiesel, Iltis und Fuchs gefunden (Lledo et al., 2014).

Tabelle 2: Spotted Fever Group Rickettsiae: Überblick Seroprävalenzen bei Mensch und Tier – Auszüge aus der Literatur

Mensch/Tier	Rickettsienspezies	Anzahl der untersuchten Seren	Seroprävalenzen	Methode	Land/ Region	Referenz
Mensch	SFG	1600	1,2%	CFT	Deutschland, Hessen	(Schmatz et al., 1977)
		286	9,1%	IFA	Deutschland	(Jansen et al., 2008)
		560	11,0-55,0%	IFA	Deutschland, Brandenburg	(Wölfel et al., unpublished)
	<i>R. helvetica</i>	1200	9,5%	IFA	Tirol, Österreich und Italien	(Somleitner et al., 2013)
	<i>R. conorii</i>	397	2,6%	micro-IFA	Schweden	(Elfving et al., 2008)
		150	8,0%	IFA	Barcelona, Spanien	(Segura-Porta et al., 1998)
Hund	<i>R. conorii</i>	102	5,88%	IFA	Burgos, Spanien	(Lledo et al., 2014)
		368	57,0%	micro-IFA	Australien, Launceston	(Izzard et al., 2010)
	<i>R. conorii</i>	649	24,6%	IFA	Spanien	(Amusategui et al., 2008)
		451	38,5-62,0%	IFA	Portugal	(Alexandre et al., 2011)
		85	64,3-89,5%	IFA	Israel	(Harrus et al., 2007)
	<i>R. conorii</i>	466	56,4%	IFA	Spanien	(Solano-Gallego et al., 2006b)
		138	26,1%	IFA	Barcelona, Spanien	(Segura-Porta et al., 1998)
	<i>R. rickettsii</i>	111	70,0%	IFA	Arizona, USA	(Demma et al., 2006)
		247	5,7%	IFA	Arizona, USA	(McQuiston et al., 2011)
	<i>R. felis</i>	292	50,7%	IFA	Australien	(Hii et al., 2013)
Katze	SFG	212	27,8%	IFA	Spanien	(Segura et al., 2014)
		212	15,6-19,5%	IFA	Spanien	(Segura et al., 2014)
	<i>R. conorii</i>	212	1,9-6,2%	IFA	Spanien	(Segura et al., 2014)
	<i>R. felis</i>	212	5,2-7,5%	IFA	Spanien	(Segura et al., 2014)
Wildtiere	<i>R. conorii</i>	375	27,3%	IFA	Burgos, Spanien	(Lledo et al., 2014)
Farmtiere	<i>R. conorii</i>	281	11,4%	IFA	Burgos, Spanien	(Lledo et al., 2014)

CFT: Complement fixation test (Komplementbindungsreaktion)

1.7. Klinik

Die verschiedenen SFG Rickettsien können beim Menschen und beim Hund unterschiedliche Krankheitsbilder auslösen.

Rickettsiosen beim Menschen

Allgemein sind die Rickettsiosen des Menschen durch Fieber, Kopfschmerzen, Exantheme sowie Veränderungen im Blutbild und Serumchemie (z.B. Thrombozytopenie, abnorme Leukozytenwerte und erhöhte Leberwerte) gekennzeichnet (Parola and Raoult, 2001; Walker, 2007). Charakteristisch sind der makulopapuläre Hautausschlag und der typische Eschar oder „tache noire“ um die Zeckenstichstelle. Dabei handelt es sich um nekrotisches, schwärzlich verfärbtes Gewebe, das von einem rotem Hof umgeben ist (Brouqui et al., 2004).

Die bedeutendste Rickettsiose ist das RMSF, das durch *R. rickettsii* ausgelöst wird. Es führt noch immer in 20-40% der Fälle zum Tode des Patienten. Fallbeschreibungen gibt es aus Kanada, den USA, Mexiko, Costa Rica, Panama, Argentinien, Brasilien und Kolumbien (Parola et al., 2013). Neben der für Rickettsiosen typischen Symptomatik kann es zu Komplikationen wie Enzephalitis und Gerinnungsstörungen kommen (Demma et al., 2006). Im Mittelmeerraum ist die bedeutendste Rickettsiose das MSF, welches durch *R. conorii* verursacht wird. Die Symptome sind für eine Rickettsiose typisch und es treten außerdem Muskel- und Gelenkschmerzen auf (Harrus et al., 2007).

Die sechs verschiedenen in Deutschland vorkommenden Rickettsienarten haben ebenfalls humanpathogenes Potential (Dobler and Wölfel, 2009; Nilsson et al., 1999; Oteo et al., 2004; Oteo and Portillo, 2012).

Rickettsia helvetica wurde 1979 erstmals aus Zecken der Spezies *I. ricinus* aus der Schweiz isoliert (Beati et al., 1993; Burgdorfer et al., 1979). Circa 20 Jahre lang galt diese Rickettsienart als apathogen, bis Nilsson et al. (1999) *R. helvetica* mit einer Perimyokarditis und einem plötzlichen Herztod in Verbindung brachten. Es folgten Fallbeschreibungen mit mildem spezifischen Fieber in Frankreich, Thailand und Italien (Parola et al., 2005). Die Pathogenität wird allerdings von einigen Rickettsiologen immer noch kontrovers diskutiert (Parola et al., 2013; Walker et al., 2003).

Rickettsia felis löst das sogenannte „flea-borne spotted fever“ aus (Dobler and Wölfel, 2009; Madeddu et al., 2012). Der Erreger wurde 1990 das erste Mal als rickettsienartig beschrieben, 1992 wurde er dann aufgrund der *R. typhi* ähnlichen Morphologie der TG zugeordnet (Adams et al., 1990; Azad et al., 1992). Erst seit der molekularen Beschreibung von Bouyer et al. (2001) wird *R. felis* der SFG zugeordnet. Der erste humane Krankheitsfall wird 1994 in Texas beschrieben (Schriefer et al., 1994); mittlerweile sind Fälle aus mindestens 12 verschiedenen Ländern weltweit bekannt (Reif and Macaluso, 2009).

Rickettsia massiliae und *R. monacensis* sind Auslöser des „tick-bite fever“ (Dobler and Wölfel, 2009). Der erste Fall einer Infektion mit *R. massiliae* wurde 2005 nachgewiesen. Dabei handelte es sich um einen Fall von 1985, der fälschlicherweise als *R. conorii* Infektion diagnostiziert worden war. Der 45-jährige Patient hatte Fieber, einen makulopapulären Ausschlag an Handflächen und Sohlen und eine ggr. Hepatomegalie (Parola et al., 2005; Vitale et al., 2006). *Rickettsia monacensis* wurde in einer Fallstudie über zwei Patienten aus Spanien beschrieben, die Fieber, Kopf- und Gelenkschmerzen sowie makulopapulären Ausschlag zeigten (Jado et al., 2007). In einer Fallstudie aus 2011 wird ein 28-jähriger, mit *R. monacensis* infizierter Mann beschrieben, der Fieber, Kopfschmerzen sowie eine von Erythem und Ödem umgebene krustige Läsion zeigte (Madeddu et al., 2012).

Rickettsia slovaca ist Verursacher der tick-borne lymphadenitis (TIBOLA) oder Dermacentor-borne necrosis erythema lymphadenopathy (DEBONEL). Dies ist eine Erkrankung mit Fieber, Kopfschmerzen, regionaler Lymphadenopathie, einem Eschar und geringfügigen Abweichungen in den Leberwerten. Der für SFG Rickettsiosen typische Ausschlag muss hier nicht zwangsläufig auftreten (Ibarra et al., 2006; Oteo et al., 2004; Parola et al., 2009). Das Krankheitsbild wurde auch schon in Deutschland beschrieben (Rieg et al., 2011).

Rickettsia raoultii wurde gerade in jüngerer Zeit durch Fälle bekannt, die klinisch der TIBOLA/DEBONEL ähneln (Mediannikov et al., 2008; Oteo and Portillo, 2012). In der Fallstudie von Switaj et al. (2012) wird über ein 17-jähriges Mädchen berichtet, das Symptome der TIBOLA/DEBONEL zeigt. Die Untersuchung mittels eines micro-IFA, der mit 6 verschiedenen Rickettsienarten gespottet wurde, konnte *R. raoultii* eindeutig als die am deutlichsten reagierende Spezies einstufen. Auch Parola et al. (2009) konnte bei 8% von Patienten mit

Symptomen, die der TIBOLA/DEBONEL entsprachen, Antikörper gegen *R. raoultii* nachweisen.

Rickettsien beim Hund

SFG Rickettsien können auch beim Hund klinische Symptome auslösen. In Nordamerika sind schwere Erkrankungen durch die Infektion mit *R. rickettsii* beschrieben (Shaw et al., 2001). Symptome wie Lethargie bis hin zum Stupor, zentralnervöse Symptome wie Ataxie, Nystagmus und Ophistotonus und dermatologische Veränderungen wie Erytheme und Ekchymosen sind typisch und auf Vaskulitiden zurückzuführen (Paddock et al., 2002). In einer experimentellen Infektion von Hunden mit *R. rickettsii* wurden drei Gruppen gebildet. Die erste Gruppe wurde direkt mit infizierten Verozellen (*R. rickettsii*, Taiacu strain) geimpft, die zweite Gruppe wurde durch den Kontakt mit je zehn infizierten *Amblyomma aureolatum* Zecken mit *R. rickettsii* in Kontakt gebracht und die dritte Gruppe diente als Kontrollgruppe. Alle Hunde der ersten beiden Gruppen entwickelten klinische Symptome wie Fieber, Lethargie, Anorexie, Augenschäden, Thrombozytopenie und Anämie und es konnte Rickettsien-DNA im Blut nachgewiesen werden. Der erste Nachweis gelang 3-8 Tage nach der Infektion, die Bakteriämie dauerte etwa 3-13 Tage (Piranda et al., 2008).

Im Mittelmeerraum gibt es vereinzelte Fallberichte über Infektionen von Hunden mit *R. conorii*. Solano-Gallego et al. (2006a) berichten von drei Hunden, die unabhängig voneinander beim Tierarzt wegen Erbrechen, Anorexie, schlechtem Allgemeinbefinden und intermittierender Lahmheit vorgestellt wurden. Durch PCR, DNA-Sequenzierung und Antikörpermessung mittels IFA konnte *R. conorii* als das ursächliche Agens identifiziert werden. Alexandre et al. (2011) testeten 400 gesunde Hunde und weitere 51, bei denen Verdacht auf eine durch Zecken übertragene Erkrankung bestand, auf eine Infektion mit *R. conorii*. Die Krankheitssymptome bestanden aus Fieber, petechialem Hautausschlag, vermindertem Allgemeinbefinden, Erbrechen, Durchfall und Anorexie. In der Gruppe der klinisch gesunden Hunde wurde eine Seroprävalenz von IgG-Antikörpern gegen *R. conorii* von 38,5% festgestellt, bei den klinisch erkrankten Hunden eine Seroprävalenz von 68%. Außerdem konnte bei sieben erkrankten Hunden *R. conorii*-DNA aus dem Blut nachgewiesen werden.

Bisher gibt es in Deutschland keine Daten zur Seroprävalenz von Antikörpern

gegen Rickettsien der SFG beim Hund. Über das Auftreten von klinischen Symptomen, die durch SFG Rickettsien ausgelöst werden, ist ebenfalls noch nichts bekannt.

1.8. Diagnostik

Zur Diagnose einer Rickettsieninfektion sind mehrere Schritte nötig (Abb. 3).

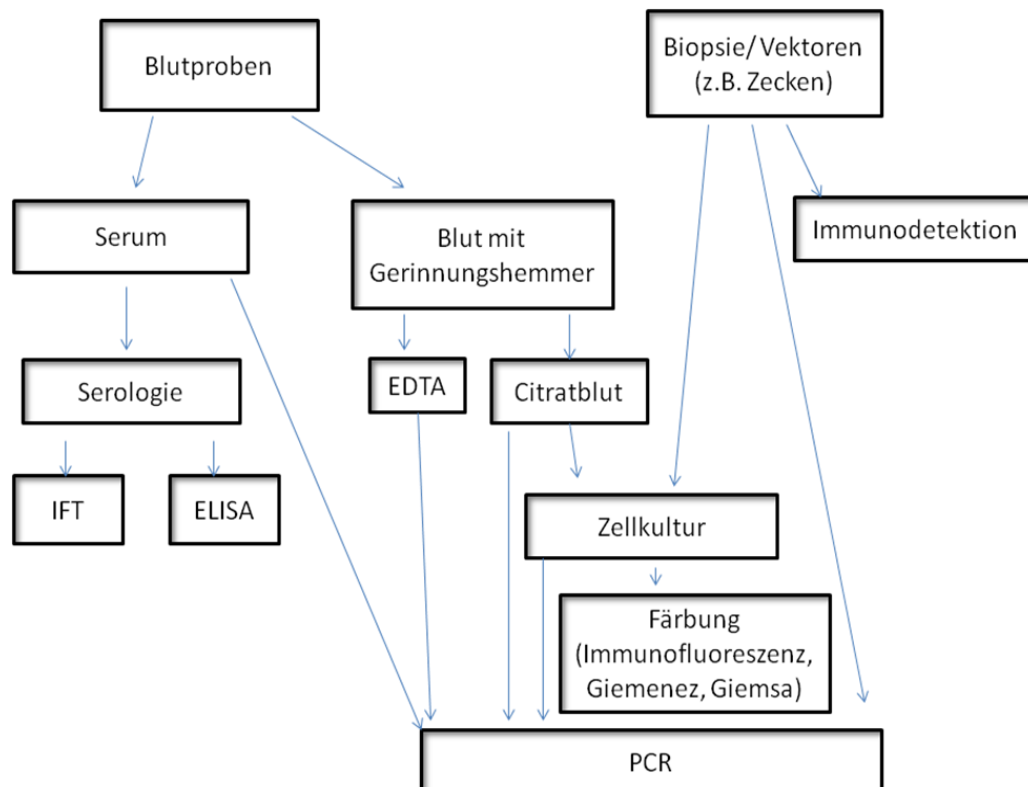


Abb. 3: Diagnostische Möglichkeiten bei Rickettsiosen

[Quelle: (Brouqui et al., 2004), modifiziert]

Die Klinik der Rickettsiosen zeigt sich beim Menschen circa 6 - 10 Tage und beim Hund 3 - 8 Tage nach dem Zeckenstich (Brouqui et al., 2004; Piranda et al., 2008).

Da die Symptome jedoch je nach beteiligter Rickettsienart variieren, sollte bei unklarer Symptomatik, speziell bei nicht erklärbarem Fieber nach einem Zeckenstich, eine weiterführende Diagnostik eingeleitet werden (Parola et al., 2013; Piranda et al., 2008).

1.8.1. Zellkultur.

Die Zellkultur ist eine der sichersten Methode eine Infektion mit Rickettsien nachzuweisen. Diese Methode ist sehr spezifisch, aber nicht so sensitiv wie die Serologie oder die molekulare Diagnostik mittels der quantitativen Polymerase kettenreaktion (qPCR) (Parola et al., 2013). Zur Kultivierung eignen sich Blutproben [Vollblut mit Gerinnungshemmer Ethylendiamintetraacetat (EDTA) oder Heparin], Hautbiopsien (am besten aus dem Eschar) oder Arthropoden (Parola et al., 2013). Die Proben müssen vor einer antibiotischen Behandlung des Patienten genommen und innerhalb von 24 Stunden verarbeitet werden (Dobler and Wölfel, 2009; Parola et al., 2013). Da sich die Rickettsien ausschließlich intrazellulär vermehren können, eignen sich für die Anzucht Zellkulturen [Vero, L929, human erythroleukemia cell line (HEL), *Xenopus laevis* tissue culture (XTC -2), Medical Research Council (MRC) 5] oder lebende Zellen (embryonierte Hühnereier oder Mäuse im Tierversuch) (Parola et al., 2005). Um die Rickettsien in der Zellkultur nachzuweisen, kann diese mit einer Färbung nach Gimenez mikroskopisch untersucht, mit einer Fluoreszenzfärbung detektiert oder alternativ durch PCR untersucht werden (Brouqui et al., 2004). Trotz der mittlerweile steigenden Erfahrung in der Anzucht von Rickettsien gehen bei 1/3 der infizierten Kulturen die Rickettsien bei der Passagierung in eine neue Zellkultur verloren (Parola et al., 2005).

Allerdings ist diese Art der Diagnostik sehr aufwendig, langwierig und erfordert erfahrenes Personal im Umgang mit Zellkulturen. Typischerweise erfolgt die Kultivierung von Rickettsien nur in Sicherheitslaboratorien der Stufe 3 (Parola et al., 2005).

1.8.2. Molekularbiologische Methoden

Der molekularbiologische Nachweis einer Rickettsieninfektion beim Mensch gelingt am besten aus Biopsiematerial des Eschars, aber auch EDTA- oder Citrat-Vollblut können verwendet werden (Brouqui et al., 2004).

Es stehen gattungs- und speziesspezifische PCR-Verfahren zur Verfügung (Dobler and Wölfel, 2009). Bei den gattungsspezifischen Verfahren ist eine Sequenzanalyse zur Abgrenzung der verschiedenen Rickettsienarten unabdingbar. Die speziesspezifischen PCR-Verfahren sind mittlerweile für häufige vorkommende Rickettsienarten wie z.B. *R. conorii*, *R. rickettsii*, *R. typhi*, *R.*

slovaca und *R. helvetica* verfügbar (Dobler and Wölfel, 2009). Es werden verschiedene PCR-Verfahren wie die qPCR und die nested PCR angewandt, die je nach angewandten Primern verschiedene Genabschnitte [Oberflächenprotein A (ompA), Oberflächenprotein B (ompB), Citrat-Synthase-Gen (gltA), gene D] amplifizieren können (Fournier and Raoult, 2004; Parola et al., 2005).

1.8.3. Serologie

Historisch gesehen war der Weil-Felix-Test der Goldstandard zum serologischen Nachweis von Rickettsien. Dabei wurde die Kreuzreaktivität zwischen den Rickettsien und einem *Proteus vulgaris*-Stamm genutzt und die Agglutination bewertet. Da die Sensitivität und Spezifität dieses Tests aber nicht sehr hoch sind, wurde er durch die Immunfluoreszenz abgelöst (Brouqui et al., 2004).

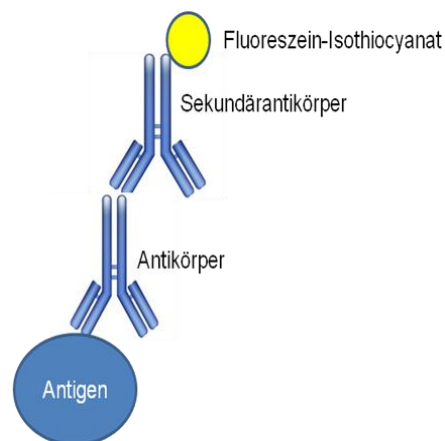


Abb 4: Prinzip des Immunfluoreszenztest

Der Mikro - Immunfluoreszenz-Antikörper-Test (micro-IFA) gilt momentan als Referenzmethode in der serologischen Diagnostik von Rickettsiosen (Parola et al., 2005). Hierbei binden Serumantikörper an auf einem Objektträger fixierten Antigenen. Ein mit Fluoreszein-Isothiocyanat konjugierter Sekundärantikörper bindet an den Serumantikörper und kann dann unter dem Fluoreszenzmikroskop gesehen werden (Abb. 4). Um akute Infektionen zu erkennen können die IgM-Antikörper aus einem akuten Serum, oder die IgG-Antikörper aus einem Serumpaar gemessen werden. Die Behandlung mit Antibiotika kann dabei die Bildung von Antikörpern unterdrücken. Brouqui et al. (2004) beschrieb den micro-IFA als sinnvolle Methode durch paralleles Testen von bis zu neun verschiedenen Rickettsienspezies in einem Feld eine Speziesdifferenzierung durch Bestimmung der Endtiter durchzuführen. Voraussetzung ist allerdings das Wissen

um die in der Region vorkommenden Rickettsienarten (La Scola and Raoult, 1997).

Der Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) gilt als sensitive Methode, die leicht durchzuführen ist. Das nachzuweisende Antigen wird hierbei an eine Mikrotiterplatte gebunden. Sind im zu testenden Serum Antikörper gegen das nachzuweisende Antigen enthalten, können sie an diesem binden. Ein Enzym-gekoppelter Sekundärantikörper bewirkt dann einen Farbumschlag eines zugesetzten Substrats, der photometrisch gemessen wird. Mit ihm kann auch eine Differenzierung zwischen IgG- und IgM-Antikörpern durchgeführt werden (La Scola and Raoult, 1997). Zuerst wurde der ELISA für *R. typhi* und *R. prowazekii* entwickelt, später gab es diverse Adaptionen zum Beispiel an *R. rickettsii* (La Scola and Raoult, 1997). Modifikationen der Methode ELISA gab es auch durch Furuya et al. (1991) indem ausschließlich monoklonale Antikörper zur Detektion des Antigens genutzt sowie durch Do et al. (2009) indem rekombinante Proteine (ompA bzw. OmpB) als Antigen verwendet wurden.

Der Westernblot kann aufgrund der Kreuzreaktivität der Rickettsienarten falsche positive Ergebnisse ergeben, aber gerade wenn mit Seren bereits eine Vorabsorption durchgeführt wurde, kann er helfen, die verschiedenen Rickettsienarten zu differenzieren. Diese Technik wird momentan allerdings nur in wenigen Referenzlaboratorien durchgeführt (Brouqui et al., 2004; Dobler and Wölfel, 2009).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Probensammlung und –material

Serum- und EDTA-Blutproben von Hunden wurden von August 2012 bis Januar 2014 gesammelt. Zusätzlich wurde zu jedem Hund ein Fragebogen vom betreuenden Tierarzt in Zusammenarbeit mit den Besitzern ausgefüllt.

Die Proben stammen aus allen Regionen Deutschlands. Zur geographischen Auswertung wurde Deutschland in fünf Regionen unterteilt (Abb. 5).

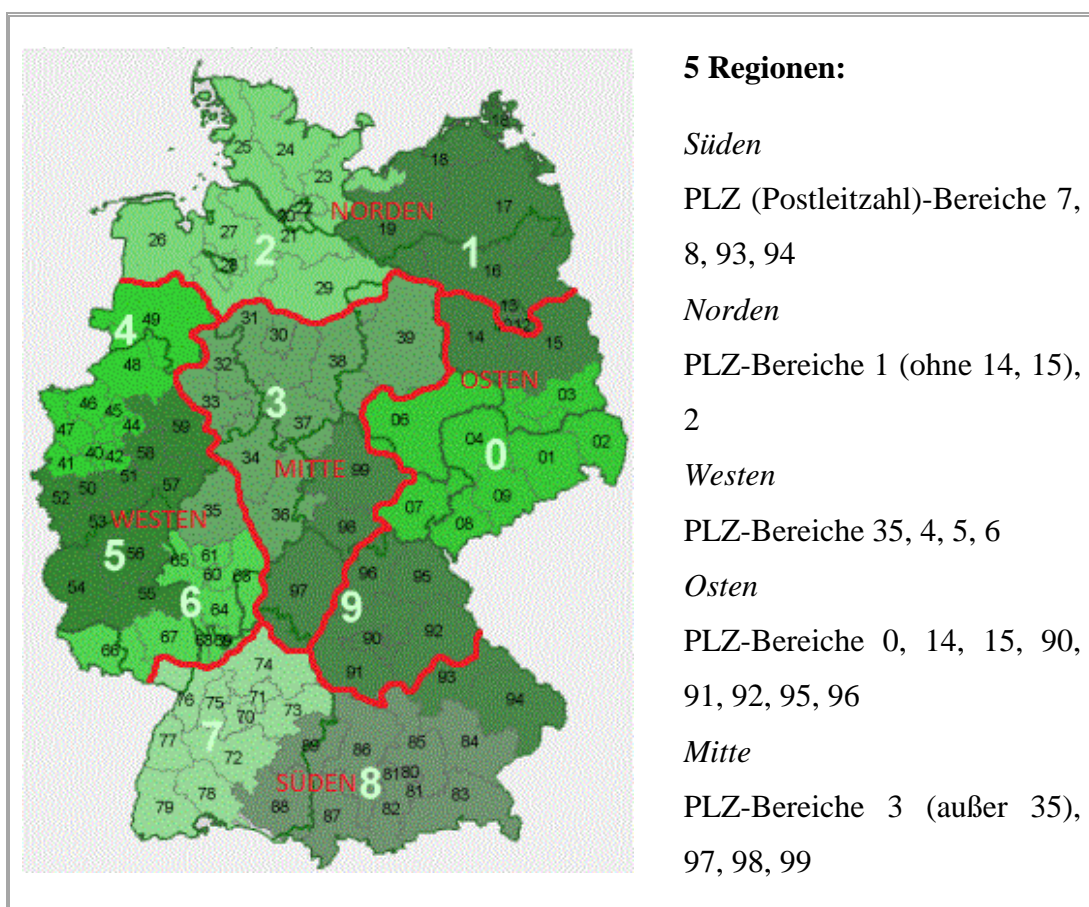


Abb. 5: Geographische Einteilung Deutschlands in fünf Regionen

1.1. Ein- und Ausschlusskriterien

Für die Hunde in der Studie galten folgende Ein- und Ausschlusskriterien:

Einschlusskriterien:

- Spezies Hund
- Herkunftsland Deutschland

- Hund darf Deutschland nie verlassen haben
- Blutentnahme muss aus anderen Gründen als der Studie erfolgen
- die Minimaldaten müssen vorhanden sein

Ausschlusskriterien

- Importhunde
- Hunde die Deutschland schon einmal verlassen haben (Urlaub etc.)
- Minimaldaten (siehe III.1.2.) nicht vorhanden
- Blutentnahme aus klinischen Gründen nicht notwendig

1.2. Minimaldaten und zusätzliche Daten

Mittels eines Fragebogens wurden zu jedem Hund die Minimaldaten sowie einige zusätzliche Daten wie folgt erhoben:

Minimaldaten:

- Alter
- Geschlecht
- Rasse
- Wohnort
- Gesundheitszustand (gesund/krank)
- Zeckenprophylaxe (ja/nein/unbekannt) bzw. Zeckenbefall
- Datum der Blutentnahme
- Vorstellungsgrund

zusätzliche Daten:

- klinische Symptomatik
- Nutzungsart (Jagdhund, Wachhund, Rettungshund, Familienhund)
- Haltungsform, Spaziergewohnheiten

2. Laboruntersuchungen

2.1. Blut- und Buffy Coat-Ausstriche

Aus EDTA-Blutproben wurden jeweils ein Blutausstrich und ein Buffy Coat Ausstrich angefertigt. Zur Herstellung des Buffy Coat wurde das EDTA-Blut für 5min bei 7000U/min in einer Mikrokapillare zentrifugiert und aus der Grenzschicht zwischen roten Blutkörperchen und dem Blutplasma ein Ausstrich angefertigt (Abb. 6).

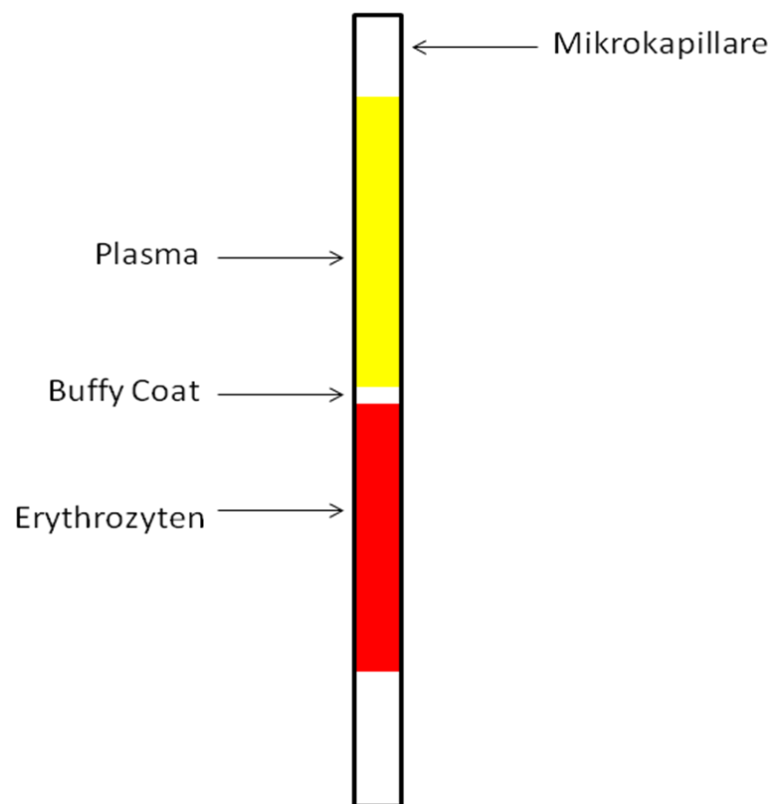


Abb. 6: Auftrennung des Vollbluts in einer Mikrokapillare nach Zentrifugation

Anschließend wurden der Buffy-Coat- und der Blutausstrich in Methanol 10min fixiert und 45min mit Giemsalösung angefärbt.

Die Ausstriche wurden mit einem Lichtmikroskop (Leitz Diaplan, Wetzlar, Deutschland) unter einer 100x Vergrößerung auf Blutparasiten durchgemustert.

2.2. ELISA

Alle Serumproben wurden mittels eines kommerziellen Testkits auf Antikörper

der SFG Rickettsien gescreent. Hierbei kam der Spotted fever group canine IgG ELISA Kit von Fuller Laboratories nach Anweisung des Herstellers zur Anwendung (Fuller Laboratories, Fullerton, Kalifornien, USA).

Zunächst wurden alle Patientenseren, die Positiv- und Negativ-Kontrollen sowie der Cut-off Calibrator mit einer Lösung aus phosphate buffered saline (PBS)-Puffer und bovinem Serumalbumin 1:100 verdünnt, 100µl davon auf eine Mikrotiterplatte pipettiert und für 60min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation fanden vier Waschvorgänge mit einem PBS Waschpuffer (pH 7,2) statt. Anschließend wurden in jede Vertiefung 100µl Enzymkonjugat [IgG horseradish peroxidase (HRP) Konjugat] pipettiert und die Platte für 30min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es folgten wieder vier Waschvorgänge mit PBS-Waschpuffer. Danach wurden in jede Vertiefung ein Tetramethylbenzidine (TMB) Substrat, aus Wasserstoffperoxid und TMB, pipettiert, dessen Reaktion nach genau 10min mit einer Stopp-Lösung aus verdünnter Schwefelsäure unterbrochen wurde. Anschließend wurde die Absorption in einem ELISA Reader (LEDetect 96, Lengau, Austria) mit einer Wellenlänge von 450nm gemessen (Abb. 7). Der Cut-off-Wert wurde aus den Mittelwerten des Cut-off Calibrators bestimmt und gleich 1 gesetzt. Werte von 0,9 – 1,1 liegen im fraglichen Bereich, Werte <0,9 gelten als negativ, Werte >1,1 als positiv.

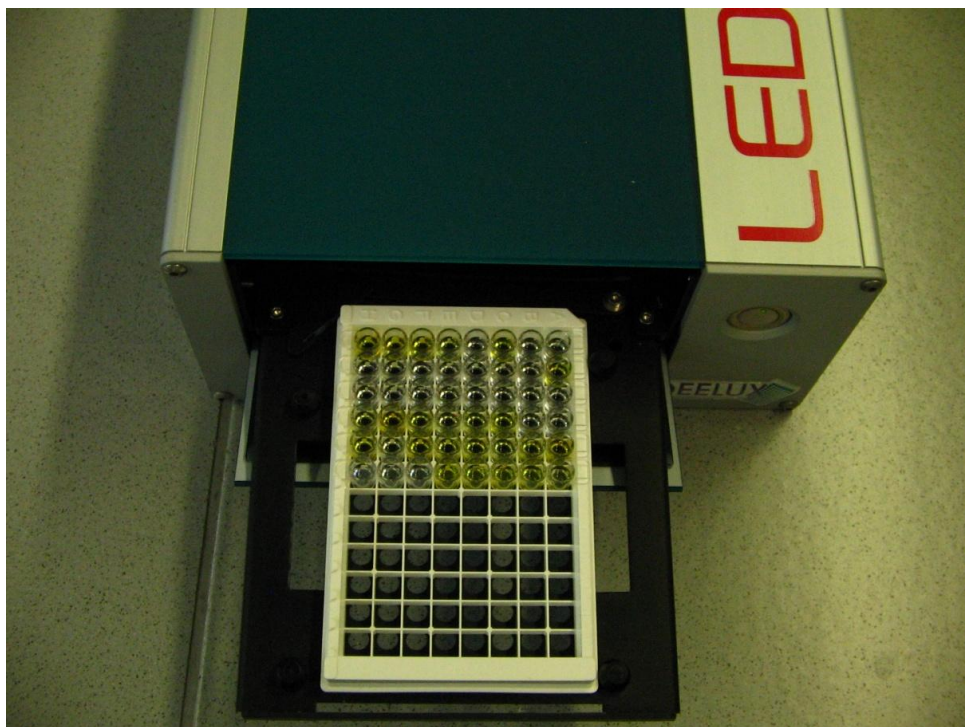


Abb. 7 : ELISA-Titerplatte kurz vor der Auswertung im ELISA-Reader

2.3. Mikro-Immunfluoreszenz

2.3.1. Herstellung der micro-IFA Slides

Die Anzucht der fünf Rickettsienarten *R. helvetica*, *R. raoultii*, *R. slovaca*, *R. monacensis* und *R. felis* wurde in sogenannten „slide flasks“ durchgeführt. Dabei handelt es sich um spezielle Zellkulturflaschen, bei denen die Anzucht direkt auf dem Objektträger (=slide) erfolgt. Darüber liegt die Flasche (=flask). Das hat den Vorteil, dass man die Zellen direkt beurteilen kann und sie nicht erst auf einen Objektträger überführen muss (Abb. 8).



Abb. 8: Slide flask (Quelle: www.sarstedt.com, 06.02.2015)

Alle Zellen wurden mit 1ml des jeweiligen Inokulums beimpft (Tab. 3) und nach 1Std. wurde das Kulturmedium hinzugegeben. Die Anzuchtzeiten und Temperaturen variierten von Spezies zu Spezies (Tab. 3).

Tab. 3: Anzucht der in dieser Studie verwendeten Rickettsien in Zellkultur: verwendetet Stämme, Zelllinien, Anzuchtzeit und -temperatur

Rickettsienspezies	Zellkultur	Anzuchtzeit	Anzuchttemperatur	Kulturmedium
<i>R. helvetica</i> (strain AS891, 6 Passage)	Vero E6 (38 Passage)	19 Tage	32°C	MEM 1xNEAA 3%FKS
<i>R. felis</i> (strain ELB, Fuller Laboratories, Fullerton, California, 1 Passage)	MEL-2 (8 Passage)	14 Tage	28°C	Insectomed express, Biochrom, Berlin, Germany
<i>R. raoultii</i> (strain <i>Khabarovsk</i> , Fuller Laboratories, Fullerton, California, 1 Passage)	Vero E6 (47 Passage)	9 Tage	28°C	MEM 1xNEAA 3%FKS
<i>R. slovaca</i> (strain RU 828, 2 Passage)	Vero E6 (39 Passage)	9 Tage	32°C	MEM 1xNEAA 3%FKS
<i>R. monacensis</i> (strain AS 78, 5 Passage)	Vero E6 (18 Passage)	14 Tage	28°C	MEM 1xNEAA 3%FKS

FKS: fötales Kälberserum

MEL: Murine erythroleukemia

MEM: Minimal essential medium

NEAA: Non-essential amino acid

Nach der Ernte des Zellrasens mittels Schaber wurde dieser zur Inaktivierung formalinisiert (24,33ml Zellsuspension und 0,67ml Formalin 37%) und 1Std bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Rickettsien mittels Nadeldisruption aus ihren Zellen freigesetzt, der grobe Zellschrott durch zweimaliges Zentrifugieren (1000g, 4 °C, 5min.) entfernt und der Überstand weiterverarbeitet.

Danach wurden die Rickettsien durch zweimaliges zentrifugieren (17000g, 4°C, 5min.) pelletiert und in 100µl PBS resuspendiert.

Zur Feststellung der Rickettsiendichte wurde die fertige Suspension in verschiedenen Stufen mit PBS verdünnt (1:2, 1:5, 1:10, 1:100, 1:200) und eine Probefärbung mit IFA und Diff-Quick® (Polysciences, Warrington, USA) zur Feststellung der Dichte durchgeführt. Um die Unterschiede in der Dichte der Suspensionen auszugleichen wurden die Rickettsienarten *R. slovaca*, *R. monacensis* und *R. felis* mit PBS 1:10 verdünnt. *Rickettsia raoultii* und *R. helvetica* wurden in unverdünnten Suspensionen weiterverarbeitet.

Die Suspensionen wurden auf einem Objektträger mit 10 Feldern mittels einer Tuschefeder (Spitzfeder, 0,5mm) aufgetragen (fünf verschiedene Rickettsienarten je Feld), luftgetrocknet und anschließend in einer Methanol/Aceton-Lösung (1:1) für 30min fixiert (Abb. 9).

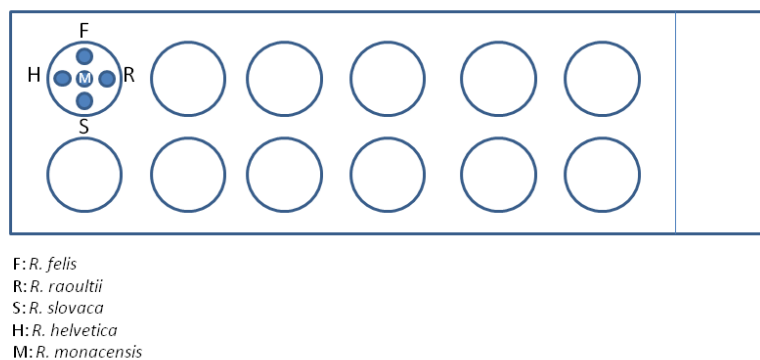


Abb. 9: Objektträger mit fünf verschiedenen Antigenen auf einem Feld

2.3.2. Durchführung der Immunfluoreszenztests

Bei jeder neuen Reihe wurden eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt. Insgesamt 30µl der Patientenverdünnungen und der Kontrollen wurden auf die einzelnen Felder pipettiert und 45min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger mit 0,2%igem PBS-Tween (Euroimmun, Lübeck, Deutschland) abgespült und zusätzlich 3x5min auf einem Schüttler in einer Küvette mit 0,2%igem PBS-Tween gespült. Nach leichter Antrocknung des Objektträgers wurden je 10µl FITC (Fluorescein isothiocyanat) anti-Hund Immunoglobulin G-Konjugat (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in der Verdünnung 1:20 mit 1 Tropfen Evans-Blue auf die Felder pipettiert. In Folge wurden die Objektträger noch einmal 30min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach erfolgte der Spülvorgang analog zu diesem nach der ersten

Inkubation. Abschließend wurden die Objektträger luftgetrocknet und mit einem Eindeckmedium (Dako, Carpinteria, Kalifornien, USA) eingedeckt.

Die fertigen Objektträger wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (Leica 5000, Wetzlar, Deutschland) unter einer 40x Vergrößerung beurteilt.

2.3.3. Screening der Proben

Das Screening der Serumproben erfolgte bei einer Verdünnung von 1:128. War in dieser Verdünnung mindestens eine der Rickettsienarten reaktiv, wurde die Serumprobe als positiv eingestuft.

2.3.4. Austitration

Es wurden 50 positive Serumproben je Region (gesamt 250 Serumproben) mittels eines Zufallsgenerators (Quelle: <http://rechneronline.de/zufallszahlen/>, 20-05-2014) ausgewählt und bis zum Endtiter austitriert.

Die Rickettsienart, die mit zwei Titerstufen Abstand den höchsten Endtiter zeigte, wurde als die Infektion verursachende Art eingestuft. Fluoreszierten mehrere Rickettsienarten im Endtiter wurde die Serumprobe als nicht differenzierbar gewertet.

3. Statistik

Die statistischen Berechnungen wurden mit SPSS® version 21.0.1., SPSS Inc., Chicago, IL, USA durchgeführt. Die exakten Konfidenzintervalle (CI 95%) der Prävalenzen wurden mit der Clopper und Pearson Methode berechnet (Clopper and Pearson, 1934).

Bei der Auswertung der ELISA-Ergebnisse wurden folgende Berechnungsmethoden angewandt: Die Korrelationen zwischen Alter, Geschlecht, Rasse, Region, Zeckenbefall, Gesundheitszustand und seropositiven Hunden wurden mit dem χ^2 -Test berechnet. Statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ und für multiple Vergleiche für $p < 0,0083$ nach Bonferroni-Korrektur angenommen.

Bei der Auswertung der micro-IFA Ergebnisse wurden folgende statistische Berechnungen verwendet: Die Korrelationen zwischen Region und seropositiven Hunden wurden mit dem χ^2 -Test und bei kleinen Probenzahlen mit dem exakten Test nach Fisher berechnet. Statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$

angenommen und für multiple Vergleiche für $p < 0,01$ nach Bonferroni-Korrektur angenommen.

Beim Vergleich der Testsysteme ELISA und micro-IFA wurden die Sensitivität bzw. Spezifität des ELISA wie folgt berechnet:

Sensitivität (true positive rate = TPR) = $TP \text{ (true positive)} / P \text{ (positive)}$;

Spezifität (SPC, true negative rate) = $TN \text{ (true negative)} / N \text{ (negative)}$;

TP und TN: Seren die positive bzw. negative auf SFG Antikörper mit dem micro-IFA getestet wurden;

P und N: Seren die positiv bzw. negativ mit dem ELISA getestet wurden.

IV. ERGEBNISSE

1. Probenmaterial

Es wurden 605 Serumproben und 301 EDTA-Proben von 605 Hunden gesammelt. Die Aufteilung des Probenmaterials nach Region und erhobenen Daten der Hunde wird in Tabelle 4 gezeigt.

Tab. 4: Aufteilung Probenmaterial von Hunden in Deutschland nach den verschiedenen Kriterien

		Anzahl der Serumproben	%
Region	Süden	62	10,2%
	Norden	61	10,1%
	Westen	148	24,5%
	Osten	280	46,3%
	Mitte	54	8,9%
Geschlecht	männlich	285	47,1%
	weiblich	320	52,9%
Rasse	Rassehund	461	76,2%
	Mischling	144	23,8%
Alter	0-2 Jahre	127	21,0%
	2-7 Jahre	280	46,3%
	≥8 Jahre	198	32,7%
Gesundheitszustand	gesund	383	63,3%
	krank	211	34,9%
	keine Angabe	11	1,8%

2. Publikationen

Die Ergebnisse hinsichtlich Seroprävalenzen, Differenzierung der Rickettsienarten und statistischer Auswertung wurden in zwei Publikationen in englischsprachigen Journals mit Gutachtersystem veröffentlicht.

2.1. Publikation 1

Seroprevalence of Spotted Fever Group Rickettsiae in dogs in Germany

Miriam Wächter¹, Martin Pfeffer², Nicole Schulz³, Anneliese Balling²,
Aleksandra Chirek⁴, Jan-Peter Bach⁵, Andreas Moritz³, Barbara Kohn⁴, Stefan
Pachnicke⁶, Cornelia Silaghi^{1,7}

Vector borne and zoonotic diseases (2015), Impact factor: 2.531

Accepted for publication: 28.12.2014

¹ Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany

² Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, Leipzig, Germany

³ Department of Veterinary Clinical Sciences, Clinical Pathology and Clinical Pathophysiology, Justus-Liebig-University, Gießen, Germany

⁴ Small Animal Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

⁵ Small Animal Clinic, Foundation University of Veterinary Medicine, Hannover, Germany

⁶Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Germany

⁷current affiliation: National Centre for Vector Entomology, Institute of Parasitology, University of Zurich, Zurich, Switzerland

Abstract

Tick-transmitted Spotted fever group Rickettsiae (SFGR) are considered emerging disease pathogens in Europe. To assess the situation in Germany a seroepidemiologic survey of dogs (n= 605, which have never left Germany) was conducted to determine the prevalence of antibodies to SFGR. For this purpose, a commercially available ELISA test for all SFGR was used. A total of 78% of the dogs were positive for antibodies of the SFGR and there was a positive correlation between age, tick-infestation and seropositivity. There was no correlation between clinical state, location and seropositivity, suggesting that infection with rickettsia is neither related to the health condition of the dogs nor to their abode in Germany. According to our results, all of Germany can be considered as an endemic area for SFGR. This should be taken into account when assessing the epidemiology of human rickettsioses and their impact on public health.

Keywords: Spotted Fever Group Rickettsia, prevalence, antibodies, dogs

Introduction

Rickettsia spp. are obligate intracellular bacteria which are transmitted by arthropods (Parola et al. 2013; Raoult and Roux 1997). They are divided into the Spotted Fever Group (SFG), the Typhus Group, the *R. bellii* group and the *R. canadensis* group (Parola et al. 2013). The SFG Rickettsiae (SFGR) are, with the exception of *R. felis* and *R. akari*, transmitted exclusively by ticks (Raoult and Roux 1997). Several previous studies showed the presence of at least six SFG Rickettsia species (*R. helvetica*, *R. monacensis*, *R. raoultii*, *R. slovaca*, *R. felis* and *R. massiliae*) in ticks in Germany with prevalences varying between 0.4% and 56.7% (Silaghi et al. 2008; Dobler and Wölfel 2009; Silaghi et al. 2011; Overzier et al. 2013). The findings of *R. felis* and *R. massiliae* in *I. ricinus* were single detections and their epidemiological meaning requires further clarification (Dobler and Wölfel 2009).

These six species have been associated with disease in humans (Dobler and Wölfel 2009; Nilsson et al. 2010; Oteo et al. 2004). Interestingly, only a few clinical cases have thus far been reported in Germany. Reasons may be an underdiagnosing of the disease due to a lack of awareness and knowledge amongst physicians about rickettsial diseases and the partly unspecific symptoms

like fever, headache, muscle pain and local lymphadenopathy. Besides some people infected with rickettsiae remain asymptomatic (Jansen et al. 2008; Elfving et al. 2008). Typical rash and inoculation eschar at the tick bite site are not seen in every clinical case (Parola et al. 2013). In a seroprevalence study on 256 hunters in Germany in 2008, 9.1% had antibodies against the SFG Rickettsiae which demonstrated exposure to *Rickettsia* spp. for humans in Germany (Jansen et al. 2008). Hunters with antibodies reported clinical signs like arthralgia, fever and swollen lymph nodes more frequently than the ones without, even though the difference was not statistically significant. None of the seropositive hunters reported an eschar (Jansen et al. 2008). Dogs can serve as a sensitive indicator for the presence and magnitude of the exposure for humans to tick-borne diseases (Tesouro et al. 1998), as they are a constant companion for humans and are comparably much more exposed to ticks.

Until now, nothing is known about the prevalence of SFGR in dogs in Germany. Therefore the aim of this study was to collect first data about seroprevalences of antibodies against SFGR in dogs in Germany and to examine the correlation between several risk factors and seropositivity. This will contribute to the knowledge of the epidemiological situation in Germany, and will give a first hint for evaluating the risk for humans to be exposed to SFGR.

Materials and Methods

Altogether, 605 serum samples and 301 EDTA-samples of dogs (n=605) from all areas of Germany were collected from August 2012-January 2014 (figure 1). Inclusion criteria for the dogs to enter the study were (i) Germany as the place of birth, (ii) never having left Germany in their lifetime, (iii) reason of blood collection another than the study and (iv) presence of the minimal data. The minimal data for each dog were collected with a questionnaire for the owner and included data on blood collection, sex, age, breed, location, clinical state (healthy or sick) and tick infestation. Additional information were presenting reasons, clinical symptoms, walking habits and kind-of-use (hunting dog, family dog etc). Exclusion criteria for the dogs were import from abroad, travel outside of Germany, minimal data not complete and/or blood collection not necessary for a clinical reason.

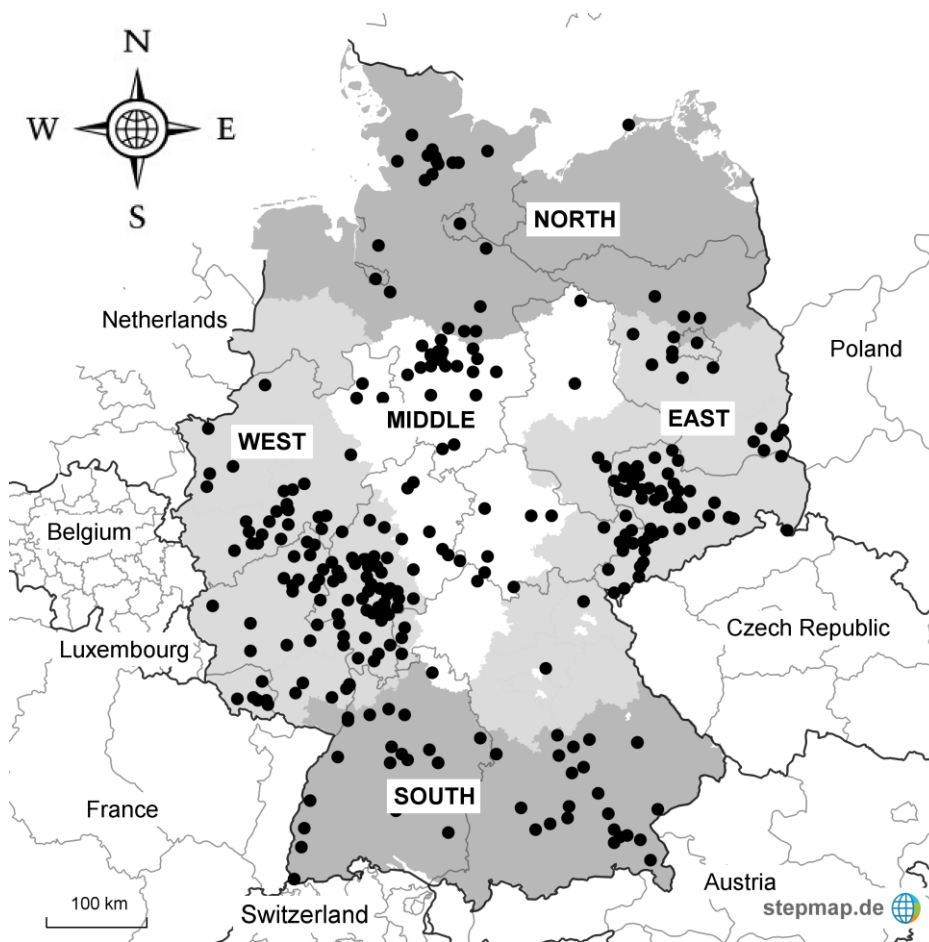


Figure 1

Distribution of origin of dogs included in this study on seroprevalence of Spotted Fever Group Rickettsiae in Germany. Each dot represents a dog.

Blood and buffy coat smears were made out of the EDTA-samples, stained with Giemsa and screened microscopically at a 1000x magnification for blood parasites. Each serum sample was tested for the presence of IgG-antibodies against SFGR with a commercial ELISA according to the manufacturer's instructions (Canine Spotted Fever Rickettsia EIA IgG Antibody Kit, Fuller Laboratories, Fullerton, California, USA). The cutoff value was defined as the mean value of the two cutoff calibrator absorbances and set at an index of 1. Indices of 0.9 to 1.1 were considered equivocal, indices above 1.1 were positive, indices below 0.9 were considered negative.

Statistical analyses were done with SPSS® version 21.0.1., SPSS Inc., Chicago, IL, USA. Correlations between age, sex, breed, location, tick infestation, clinical state and seropositivity were compared with the χ^2 -test. Statistical significance was considered at a p-value <0.05 and corrected for multiple comparisons with

the Bonferroni adjustment to $p < 0.0083$. 95% Confidence intervals (CI) were calculated individually for each proportion with the Clopper and Pearson method. Three of the 605 serum samples tested equivocal and were not included in the statistical analysis.

Results

In total 469 out of 602 (77.9%; CI: 74.4%-81.2%) of the dogs were positive for antibodies against the SFGR. Blood pathogens were neither directly visible in any of the Giemsa-stained blood smears nor in the buffy coats.

The seroprevalences in the different locations were 52 out of 62 (83.9%; CI: 72.3%- 92.0%) in the south, 47 out of 61 (77.0%; CI: 64.5%-86.9%) in the north, 112 out of 147 (76.2%; CI: 68.5%-82.8%) in the west, 211 out of 278 (75.9%; CI: 70.4%-80.8%) in the east and 47 out of 54 (87.0%, CI: 75.1%-94.6%) in the middle of Germany. There was a statistically significant positive correlation of seroprevalence with age and tick infestation (Table 1).

Table 1: Seropositivity for Spotted Fever Group rickettsia in dogs in Germany regarding age and tick infestation ($p < 0.0083$)

Category	No. seropositive/ No. total	% positive (CI)	p-value
age			$p < 0.0001$
young (0-2 years)	58/127	45.7 % (36.8%-54.7%)	
adult (2-7 years)	228/276	82.6 % (77.6%-86.9%)	
senior (>8 years)	183/199	92.0 % (87.3%-95.3%)	
tick infestation			$p < 0.0001$
none observed	16/28	57.1% (37.2%-75.5%)	
<5 ticks/month	163/232	70.3% (63.9%-76.1%)	
5-20 ticks/month	52/55	94.5 % (84.9%-98.9%)	

No statistically significant difference was observed for sex ($p = 0.82$), breed ($p = 0.54$), location ($p = 0.31$) and clinical state ($p = 0.66$).

Discussion

The study revealed that >75% of dogs that have never left Germany had antibodies against rickettsia of the SFG. Dogs are considered suitable as sentinel animals to assess the geographic distribution and the exposure risk for humans of

rickettsioses and other vector-borne diseases. This was previously shown for Lyme Borreliosis, Mediterranean Spotted Fever and Rocky Mountain Spotted Fever (Tesouro et al. 1998; Rand et al. 1991; McQuiston et al. 2011). Considering the high seroprevalences found in Germany we conclude that Germany is an endemic area for certain SFGR and that there is a considerable risk of infection also for humans (Wölfel et al. July 2012). It is controversially discussed if dogs could act as a reservoir for *Rickettsia* spp., and could therefore play an important role in the epidemiology of human rickettsioses. Previous studies showed that dogs infected with *R. conorii* can act as a reservoir for this *Rickettsia* species as transmission to previously uninfected ticks was possible even in dogs without detectable rickettsemia (Levin et al. 2012). Immunization of dogs can reduce this reservoir competence, but on dogs which are continuously exposed to *Rickettsia*-infected ticks, the high efficiency of transmission between cofeeding ticks may negate effects of the preexisting immunity (Levin et al. 2014). The positive correlation between age and seropositivity could be explained on the one hand by the persistence of antibodies over the years (Tesouro et al. 1998) and on the other hand by the boost of antibodies due to a continuous reinfection (Levin et al. 2014). As most dogs probably are bitten by *Rickettsia*-infected ticks more than once in their lifetime, an increasing cumulative seroprevalence with age seems reasonable.

Conclusion

In conclusion, this study shows a high seroprevalence (>75%) of SFGR in dogs in Germany, indicating Germany as an endemic area of SFGR. Dogs may, on one hand, play a role as a reservoir host for SFGR and may therefore be an important link in the transmission chain, on the other hand, as sentinels they may aid in assessing the geographic distribution of Rickettsioses and the exposure risk for humans. Physicians should consider Rickettsioses in Germany as a differential diagnosis in febrile patients even in cases where previous tick bites are not recalled, particularly because they can lead to severe diseases (Nilsson et al. 2010).

Acknowledgements

We thank the following persons for providing the blood samples: Prof. Dr. Ingo Nolte, University of Veterinary Medicine, Hannover; Dr. Sabine Schall, Schifferstadt; Elisabeth Stemmler, Hohenwestedt, Veterinary clinic Dr. Stefan Reindl, Ingolstadt, veterinary practice Dr. Ebenboeck and colleagues, Traunstein, Dr. Uwe Urban, Amerang, Anuschka Winkelmann, St. Wolfgang, Johanna Gude, Eckental, Dr. Martin Steffl, University of Hohenheim, Stuttgart, Dr. Armin Reinle, Weil am Rhein, Veterinary clinic Neckarwiesen, Esslingen, Femke Mortier, Clinic of small animal medicine, Munich. Michael Leschnik, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria is acknowledged for providing the positive controls. Besides we want to thank Andrea Mihalkov and Ute Maurer for the technical assistance. The work of Martin Pfeffer and Cornelia Silaghi was done under the frame of EurNegVec COST Action TD1303. Finally we want to thank Bayer Vital GmbH for supporting Miriam Wächter with a grant.

Author disclosure statement

No competing financial interest exists.

References

- Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, Abdad MY, Stenos J, Bitam I, Fournier PE and others. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. Clin Microbiol Rev 2013;26:657-702.
- Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clin Microbiol Rev 1997;10:694-719.
- Silaghi C, Gilles J, Höhle M, Pradel I, Just FT, Fingerle V, Kuchenhoff H, Pfister K. Prevalence of spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in southern Germany. J Med Entomol 2008;45:948-55.
- Dobler G, Wölfel R. Typhus and other rickettsioses: emerging infections in

- Germany. Dtsch Arztebl Int 2009;106:348-54.
- Silaghi C, Hamel D, Thiel C, Pfister K, Pfeffer M. Spotted fever group rickettsiae in ticks, Germany. Emerg Infect Dis 2011;17:890-2.
- Overzier E, Pfister K, Thiel C, Herb I, Mahling M, Silaghi C. Diversity of *Babesia* and *Rickettsia* Species in Questing *Ixodes ricinus*: A Longitudinal Study in Urban, Pasture, and Natural Habitats. Vector Borne Zoonotic Dis 2013.
- Nilsson K, Elfving K, Pahlson C. *Rickettsia helvetica* in patient with meningitis, Sweden, 2006. Emerg Infect Dis 2010;16:490-2.
- Oteo JA, Ibarra V, Blanco JR, Martinez de Artola V, Marquez FJ, Portillo A, Raoult D, Anda P. *Dermacentor*-borne necrosis erythema and lymphadenopathy: clinical and epidemiological features of a new tick-borne disease. Clin Microbiol Infect 2004;10:327-31.
- Jansen A, La Scola B, Raoult D, Lierz M, Wichmann O, Stark K, Schneider T. Antibodies against *Rickettsia* spp. in hunters, Germany. Emerg Infect Dis 2008;14:1961-3.
- Elfving K, Lindblom A, Nilsson K. Seroprevalence of *Rickettsia* spp. infection among tick-bitten patients and blood donors in Sweden. Scand J Infect Dis 2008;40:74-7.
- Tesouro MA, Bacellar F, Sainz A, Filipe A. Persistence of antibodies to *Rickettsia conorii* in dogs. Ann N Y Acad Sci 1998;849:441-3.
- Rand PW, Smith RP, Jr., Lacombe EH. Canine seroprevalence and the distribution of *Ixodes dammini* in an area of emerging Lyme disease. Am J Public Health 1991;81:1331-4.
- McQuiston JH, Guerra MA, Watts MR, Lawaczeck E, Levy C, Nicholson WL, Adjemian J, Sverdlow DL. Evidence of exposure to spotted fever group rickettsiae among Arizona dogs outside a previously documented outbreak area. Zoonoses Public Health 2011;58:85-92.
- Wölfel S, Mertens M, Speck S, Essbauer S, Ulrich RG, Wölfel R, Dobler G. Seroprevalence of IgG against *Rickettsiae* of the Spotted Fever Group in Forestry Workers in State Brandenburg, Eastern Germany Abstract # 9.

25th Meeting of the American Society for Rickettsiology. Park City, Utah, USA July 2012.

Levin ML, Killmaster LF, Zemtsova GE. Domestic dogs (*Canis familiaris*) as reservoir hosts for *Rickettsia conorii*. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2012;12:28-33.

Levin ML, Zemtsova GE, Montgomery M, Killmaster LF. Effects of homologous and heterologous immunization on the reservoir competence of domestic dogs for *Rickettsia conorii (israelensis)*. *Ticks Tick Borne Dis* 2014;5:33-40.

2.2 Publikation 2

Serological differentiation of antibodies against *Rickettsia helvetica*, *R. raoultii*, *R. slovaca*, *R. monacensis* and *R. felis* in dogs from Germany by a micro-immunofluorescent antibody test

Miriam Wächter ¹, Silke Wölfel ^{2,3}, Martin Pfeffer ⁴, Gerhard Dobler ^{2,3}, Barbara Kohn ⁵, Andreas Moritz ⁶, Stefan Pachnicke ⁷, Cornelia Silaghi ^{1,8}

Parasites and Vectors (2015), Impact factor: 3.25

Accepted for publication: 16.02.2015

.

¹ Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Ludwig-Maximilians-University Munich, Munich, Germany

² Bundeswehr Institute of Microbiology, Munich, Germany

³ DZIF German Centre for Infection Research–Ludwig-Maximilians-University Munich, Munich, Germany

⁴ Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, Leipzig, Germany

⁵ Small Animal Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

⁶ Department of Veterinary Clinical Sciences, Clinical Pathology and Clinical Pathophysiology, Justus-Liebig-University, Gießen, Germany

⁷ Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Germany

⁸ current affiliation: National Centre for Vector Entomology, Institute of Parasitology, University of Zurich, Zurich, Switzerland

Abstract

Background

Spotted Fever Group (SFG) Rickettsiae can cause febrile diseases with or without rash in humans worldwide. In Germany only limited data are available about their medical significance. Serological screening tests for antibodies against rickettsiae usually only distinguish between SFG and Typhus Group (TG) Rickettsiae due to the strong cross reactivities within the groups. Seroprevalence rates in dogs, as possible sentinels for tick-borne diseases, could serve as an indicator for the distribution of different *Rickettsia* species.

Methods

In this study, a micro-immunofluorescence assay (micro-IFA) was established for detection and differentiation of antibodies against five *Rickettsia* species in dogs (*R. helvetica*, *R. raoultii*, *R. slovaca*, *R. monacensis* and *R. felis*). Dogs that never left Germany (n = 605) previously investigated with an SFG-ELISA were included in this study and screened at a 1:128 dilution. Endpoint titres of fifty randomly selected seropositive samples of each of the five investigated regions in Germany were determined in order to allow a differentiation of the causative *Rickettsia* species. Sensitivity and specificity of the micro-IFA were compared with ELISA results of the previous study.

Results

A total of 93.9% of the dogs were positive for antibodies of the SFG Rickettsiae at the screening titer of 1:128. Differentiation of SFG Rickettsiae with the micro-IFA was possible in 70.4%, but in 29.6% of the cases the detected antibodies were not differentiable. Considering a clear differentiation by a twofold titre difference between observed reactions, the seroprevalence rates were 66.0% for *R. helvetica*, 2.8% for *R. raoultii*, 1.6% for *R. slovaca*, but no serological reaction could be clearly attributed to *R. monacensis* or *R. felis*. No statistically significant regional differences were found for *R. helvetica*, *R. slovaca* and *R. raoultii* comparing the five regions of Germany. Comparison of micro-IFA with ELISA revealed a sensitivity of 82.0% and a specificity of 83.8% for the *Rickettsia* SFG ELISA.

Conclusions

The micro-IFA is a useful serological tool to differentiate antibodies against different *Rickettsia* species in dogs. Seroprevalence rates in dogs correspond to the prevalence rates and distribution of *Rickettsia*-carrying tick species.

Keywords

Rickettsia helvetica, *R. raoultii*, *R. slovaca*, *R. monacensis*, *R. felis*,
Seroprevalence, Differentiation, Dogs, Ticks

Background

Rickettsiae are short rod-shaped gram-negative, obligate intracellular bacteria [1]. They are, regarding the clinical and serological perspective, divided into two major groups: the Typhus Group (TG) and the Spotted Fever Group (SFG). The TG includes two members: *R. typhi* and *R. prowazekii*, the causative agents of murine typhus and epidemic typhus, respectively. The heterogeneous SFG contains >20 Rickettsiae, mainly transmitted by ticks, except for *R. felis* which is transmitted by fleas and *R. akari* which is transmitted by mites [2-4]. Recent genomic analyses indicate the division into four groups: the TG, the SFG, the ancestral group (AG) and the transitional group (TRG), which includes *R. felis* [5]. Rickettsiae of the SFG are able to cause mild to severe rickettsioses in humans. [6]. Rickettsioses are considered emerging infectious diseases worldwide [1,7]. To evaluate the epidemiological situation in different countries it is necessary to examine vectors and reservoir hosts for the occurrence of different rickettsial species. Various molecular and serological methods have been described for the detection and differentiation of *Rickettsia* species. Real-time polymerase chain reaction (PCR) is frequently applied to detect *Rickettsia* in biopsies, blood and arthropods [7]. Several conventional PCRs targeting different genomic regions for subsequent sequencing and phylogenetic analysis of rickettsiae have been published in the last decades [4,8,9]. Species-specific real-time PCRs are only available for some rickettsial species (e.g. *R. conorii*, *R. rickettsii*) [10,11]. Due to the strong serological cross-reactions among SFG Rickettsiae, the availability of serological tools for differentiation is limited, so

far. Commercially available IFA and ELISA tests are only suitable for the discrimination between SFG- and TG-Rickettsiae [1]. Brouqui et al. (2004) described a micro-immunofluorescence method which allows the investigation of up to nine different rickettsial antigens in one spot as a suitable method to differentiate the causative *Rickettsia* species by determination of endpoint titres [12]. Absorption western blotting can also be used to identify rickettsial species [13]. The rickettsial IFA adapted to the micro-method format (micro-IFA) is the test of choice for the serodiagnosis of rickettsial disease in human medicine [1]. In Germany, six species of the SFG Rickettsiae have been detected in ticks by molecular methods (Table 1). All of them have been described to cause diseases in humans. *R. helvetica* is generally associated with uneruptive fever, but cases with more severe clinical signs such as endocarditis or meningitis have been reported [14-16]. *R. monacensis*, *R. massiliae* and *R. felis* can cause classical spotted fevers and additional constitutional symptoms like fatigue, headache and myalgia [7,17-23]. Nevertheless the pathogenicity of *R. felis* is still discussed controversially [24]. *R. raoultii* and *R. slovaca* cause TIBOLA (tick-borne lymphadenopathy) or DEBONEL (*Dermacentor*-borne necrosis erythema lymphadenopathy) with a typical clinical syndrome including an eschar at the site of the tick bite and lymphadenopathy [25-27]. Data concerning clinical human cases in Germany are rare. In the recent years only a few cases have been published, among them cases of *R. slovaca* infection in 2009 and one in 2010 [27,28] and a case of *R. felis* infection in 2000 [29]. So far no clinical cases caused by *R. monacensis*, *R. helvetica*, *R. massiliae* or *R. raoultii* were described in Germany. In 2008, 9.1% of 256 examined hunters in Germany had antibodies against the SFG Rickettsiae in an IFA [30]. In 2012, an average of 27.7% of forestry workers had antibodies against the SFG Rickettsiae in the IFA with seroprevalences up to 55% in particular geographical regions (Wölfel et al., Seroprevalence of IgG against Rickettsiae of the Spotted Fever Group in Forestry Workers in State Brandenburg, Eastern Germany, unpublished). In 2014, we detected antibodies against the SFG Rickettsiae in 77.9% of 605 dogs examined with ELISA (Wächter et al., Seroprevalence of Spotted Fever Group Rickettsiae in dogs in Germany, in press). Until now no clinical cases in dogs involving the rickettsial species *R. helvetica*, *R. raoultii*, *R. slovaca*, *R. massiliae*, *R. felis* or *R. monacensis* have been reported. However, *R. rickettsii* in the USA and *R. conorii* in southern Europe can cause symptomatic diseases of variable severity in dogs

[31, 32]. *Rickettsia rickettsii* causes a severe vasculitis leading to symptoms like lethargy, anemia and neurologic symptoms [31]. *Rickettsia conorii*, causing the Mediterranean Spotted Fever in humans, can lead to symptoms like fever, diarrhea, vomiting and petechial rash in dogs [32]. In our previous study statistically significant correlations between age, tick infestation and seropositivity of the dogs were found, but no differentiation of rickettsial species was possible by ELISA (Wächter et al., Seroprevalence of Spotted Fever Group Rickettsiae in dogs in Germany, in press). Therefore, the aims of the study were (i) to establish the micro-IFA as a tool to distinguish antibodies against different rickettsial species in dogs (ii) to differentiate the antibody responses in dogs previously found positive by ELISA and (iii) to compare the micro-IFA to a commercial ELISA with regard to sensitivity and specificity.

Table 1 Prevalence rates of Spotted Fever Group Rickettsiae in ticks in Germany, according to the geographic region

<i>Rickettsia</i> species	tick species	% pos	number of ticks tested	region	Reference
<i>R. helvetica</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	5.6-13.3%	1187	BW	[33]
		12.0%	2141	BY	[34]
		4.8%	2861	BY	[35]
		6.0%	4459	BY	[36]
		14.2%	127	BE	[37]
		3.5-6.2%	3591	south of Germany	[7]
		32.9%	1089	NI	[38]
		13.4-17.4%	1702	BY/ SL/ SN	[39]
		8.5%	2186	BY	[40]
		52.5%	1400	Hamburg	[41]
		26.2%	2100	Hanover	[42]
<i>R. raoultii</i>	<i>Dermacentor</i>	30.0%	666	BW	[43]
	<i>spp.</i>	56.7%	1359	BY/ SL/ SN	[39]
<i>R. slovaca</i>	<i>Dermacentor</i>	0.8%	666	BY	[43]
	<i>spp.</i>	13.3%	15	BY/ SL/ SN	[39]
<i>R. monacensis</i>	<i>I. ricinus</i>	0.5%	2861	BY	[35]
		0.6%	3591	BY	[7]
		0.4%	4459	BY	[36]
		0.4%	1089	NI	[38]
		0.2%	2186	BY	[40]
<i>R. felis</i>	<i>I. ricinus</i>	0.4%	1450	BY/NRW	[7]
<i>R. massiliae</i>	<i>I. ricinus</i>	1.7%	57	eastern BY	[7]

BE: Berlin; BY: Bavaria; BW: Baden-Wurttemberg; NI: Lower Saxony; NRW: North Rhine-Westphalia; SL: Saarland; SN: Saxony

Methods

Samples

Altogether 605 serum samples of dogs from a previous study (Wächter et al., Seroprevalence of Spotted Fever Group Rickettsiae in dogs in Germany, in press) were tested for antibodies against five SFG Rickettsiae by micro-IFA. These samples had previously been tested for antibodies against SFG Rickettsiae by a commercial ELISA (Canine Spotted Fever Rickettsia EIA IgG Antibody Kit, Fuller Laboratories, Fullerton, California, USA) (Wächter et al., Seroprevalence of Spotted Fever Group Rickettsiae in dogs in Germany, in press). Dogs included in this study were (i) born in Germany, (ii) had never left Germany and (iii) data on sex, age, breed, location, clinical status (healthy or sick), tick infestation and date of blood collection were available.

Production of micro-IFA-slides

Rickettsia helvetica strain AS 819, *R. raoultii* strain *Khabarovsk* (kindly provided by Lee Fuller, Fuller Laboratories), *R. slovaca* strain RU 828, *R. monacensis* strain AS 787 and *R. felis* strain ELB (kindly provided by Lee Fuller, Fuller Laboratories) were cultivated in 75 cm² tissue culture flasks containing either Vero cells or *Drosophila melanogaster* cells (only *R. felis*). Readily infected cell cultures were harvested after 8 to 19 days, depending on the growth characteristics of the respective *Rickettsia* species. Identity and purity of the strains was confirmed by sequencing a part of the *ompB* gene following a protocol of Roux and Raoult (2000) [2]. After inactivation by adding formalin in a final concentration of 1% the Rickettsiae were released from their host cells by needle disruption. The suspension was centrifuged twice at 1,000 g, 4°C for 5 minutes to remove cell debris. The supernatant was collected. Centrifugation at 17,000 g, 4°C for 5 minutes followed twice. Every time the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 1.8 ml phosphate buffered saline (PBS). The final pellet was resuspended in 100 µl PBS. Serial dilutions in PBS (1:2, 1:5, 1:10) of the antigens were applied with a 10 µl piston-operated pipette to empty slides to estimate the density of rickettsial antigen by IFA and Diff-Quick® (Polysciences, Warrington, USA) staining to equalize the density of all five

rickettsial species. *R. felis*, *R. monacensis* and *R. slovaca* were diluted with PBS 1:10, *R. helvetica* and *R. raoultii* were used as undiluted solutions. The different rickettsial antigens were applied to a 10-well microscope slide with a pen-point as shown in Figure 1. The slides were air dried and fixed in methanol-acetone (1:1) for 30 min, air-dried again and stored at 4°C until use.

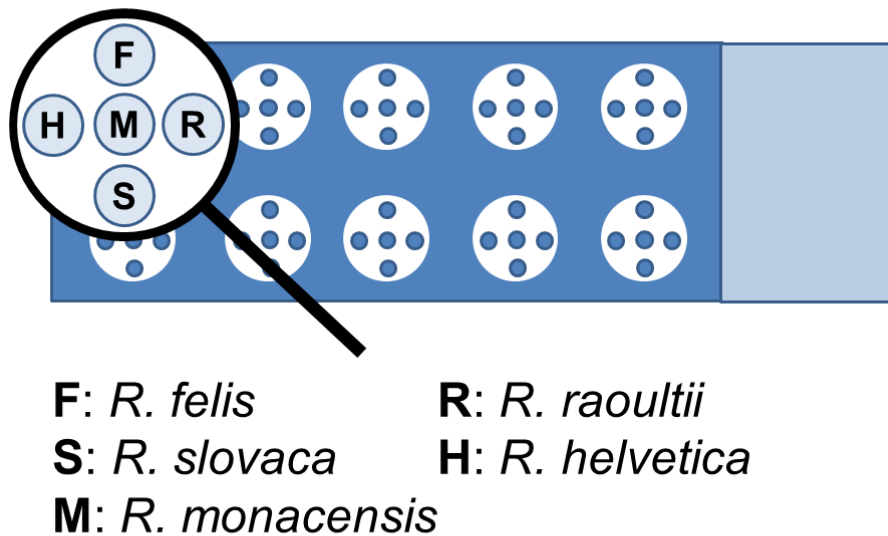


Figure 1 Arrangement of rickettsial antigen dots per spot on the Micro IFA-Slide.

Micro-IFA

A twofold serial dilution of the serum samples with PBS was made and the screening dilution of 1:128 was applied to the slide wells and incubated at 37°C for 45 min in a humid chamber. The slide was washed with 0.2% PBS-Tween (Euroimmun, Lübeck, Germany) three times for 5 min. Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled rabbit anti-dog immunoglobulin G (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) was applied in a 1:20 dilution and incubated at 37°C for 30 min in a humid chamber, washed with 0.2% PBS-Tween three times for 5 min and mounted with fluorescence mounting medium (Dako, Carpinteria, California, USA). Reactions were read with a fluorescence microscope (Leica 5000, Wetzlar, Germany) by two independent investigators. Suitable positive and negative control dog sera that had

been identified in a previous study (Wächter et al., Seroprevalence of Spotted Fever Group Rickettsiae in dogs in Germany, in press) were included in each assay. Samples were considered positive for antibodies of the SFG Rickettsiae when any of the five antigens showed distinct fluorescence patterns at the 1:128 dilution (Figure 2). Fifty positive samples of each of the five regions (Figure 1) were chosen with a random generator (source: <http://rechneronline.de/zufallszahlen/>, 20-05-2014) and subjected to end-point titration. If one rickettsial species showed at least twofold higher antibody titres than the others, it was considered the species responsible for the antibody induction. If more than one species showed fluorescence at the same end point titre the results were considered not distinguishable.

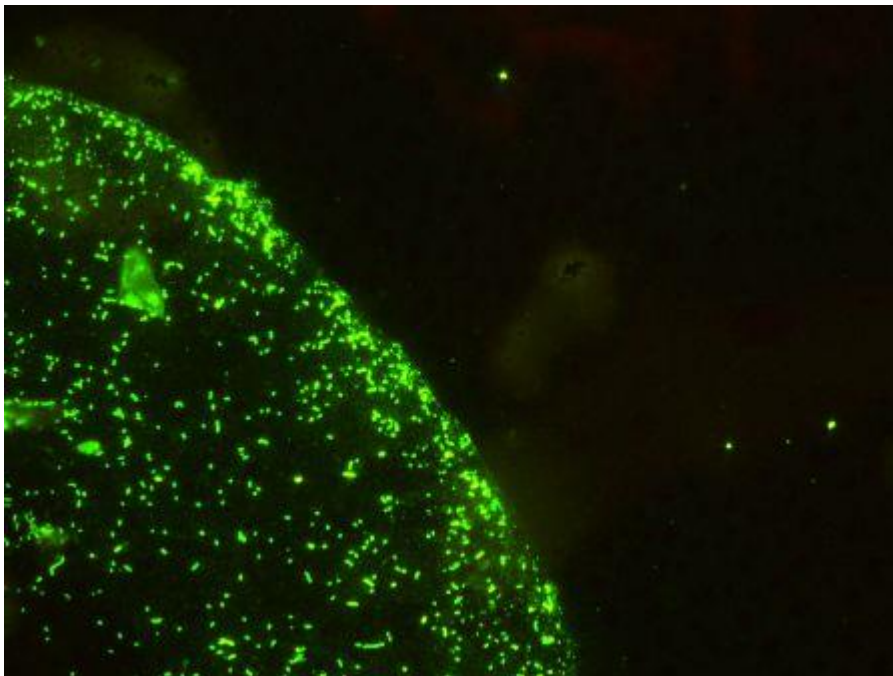


Figure 2 Positive reaction for antibodies against *Rickettsia raoultii* antigen on the Micro IFA-Slide (dilution 1:128).

Comparison ELISA-micro-IFA

The results of the screening dilution (1:128, n = 605) of this study obtained with micro-IFA were compared to results obtained with ELISA from a previous study (Wächter et al., Seroprevalence of Spotted Fever Group Rickettsiae in dogs in Germany, in press).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with SPSS® version 21.0.1., SPSS Inc., Chicago, IL, USA. Correlations between location and seropositivity were compared by χ^2 -test, for small sample sizes the Fishers exact test was used. Statistical significance was considered at a p-value <0.05. Multiple comparisons were corrected with the Bonferroni adjustment to $p < 0.01$. Confidence intervals (95% CI) were calculated individually for each proportion with the Clopper and Pearson method. Sensitivity and specificity of the ELISA was calculated as follows: Sensitivity (true positive rate = TPR) = TP (true positive)/ P (positive) and specificity (SPC, true negative rate) = TN (true negative)/ N (negative). The TP and the TN were the sera seropositive and seronegative for antibodies for the SFG tested with the micro-IFA, P and N were the sera tested seropositive and seronegative with the ELISA, respectively.

Results

At the screening serum dilution of 1:128, 568 out of 605 (93.9%; CI: 91.7%-95.7%) of the dogs showed antibodies against at least one of the SFG *Rickettsiae*. Out of the 93.9% anti-*Rickettsia* positive dog specimens 70.4% showed at least twofold higher antibody titres against one *Rickettsia* species and were therefore considered as clearly differentiable. In 23.6% of the dogs equal antibody titers against two and in 5.6% against three rickettsial antigens were observed. Only one specimen (0.4%) was reactive against four of the five *Rickettsia* species (Table 2). All of those were considered as non-differentiable with regard to the antibody-inducing *Rickettsia* species. Considering only the 70.4% clearly differentiable serum samples the total seroprevalence rates were 66.0% (CI: 59.8%-71.9%) for *R. helvetica*, 2.8% (CI: 1.1%-5.7%) for *R. raoultii*, 1.6% (CI: 0.4%-4.1%) for *R. slovaca*, 0.0% (CI: 0.0%-0.1%) for *R. monacensis* and 0.0% (CI: 0.0%-0.1%) for *R. felis*. If all positive serological reactions against the tested rickettsial species, including cross-reactive antibodies, in the randomly selected 250 positive sera (50 from each of the five regions in Germany) were considered, 94.0% (CI: 90.3%-96.6%) for *R. helvetica*, 22.8% (CI: 17.8%-28.5%) for *R. raoultii*, 5.2% (CI: 2.8%-8.7%) for *R. slovaca*, 2.0% (CI: 0.7%-4.6%) for *R. monacensis* and 0.4% (CI: 0.0%-0.2%) for *R. felis* could be observed. Titres varied for *R. helvetica* from

1:128 to 1:4096, for *R. raoultii* from 1:128 to 1:4096, for *R. slovaca* from 1:256 to 1:2048, for *R. monacensis* from 1:256 to 1:2048 and for *R. felis* from 1:128 to 1:512 (Table 3). No statistically significant different infection rates for *R. helvetica* ($p = 0.038$), *R. slovaca* ($p = 0.105$) and *R. raoultii* ($p = 0.131$) were observed comparing the five different regions of Germany (Figure 3). Statistically significant differences for *R. helvetica* were seen comparing north and south ($p = 0.042$), south and middle ($p = 0.042$) and south and west ($p = 0.007$). Comparison of ELISA (Wächter et al., Seroprevalence of Spotted Fever Group Rickettsiae in dogs in Germany, in press) and micro-IFA yielded the following results. All serum samples ($n = 605$) were tested at a cut-off titre of 1:128. With the ELISA 77.6% (CI: 74.1%-80.9%) of the samples were positive, whereas with the micro-IFA 93.9% (CI: 91.7%-95.7%). Altogether 102 samples were tested positive in the micro-IFA and negative in the ELISA and 6 samples were tested positive in the ELISA and negative in the micro-IFA. Considering this data at a cut-off titre of 1:128 the ELISA shows a sensitivity of 82.0% and a specificity of 83.8%.

Table 2 Seropositivity for SFG Rickettsiae of the dogs with regard to number and association of the different rickettsial species

Number of rickettsial species with seropositivity in dogs	rickettsial species					No. of positive animals (%)
	RH	RR	RS	RM	RF	
one	x					165
		x				7
			x			4
				x		0
					x	0
Total						176 (70.4%)
two	x	x				32
	x		x			2
	x			x		1
	x				x	20
		x			x	2
		x		x		1
		x	x			1
Total						59 (23.6%)
three	x	x	x			4
	x	x		x		2
	x	x			x	7
	x		x		x	1
Total						14 (5.6%)
four	x	x	x	x		1
Total						1 (0.4%)
Total 250 (100.0%)						

RH: *Rickettsia helvetica*.RR: *Rickettsia raoultii*.RS: *Rickettsia slovaca*.RM: *Rickettsia monacensis*.RF: *Rickettsia felis*.

SFG: Spotted fever group

Table 3 Seropositivity for 50 sera/region for *R. helvetica*, *R. raoultii*, *R. slovacica*, *R. monacensis* and *R. felis* in serum samples of dogs tested at serial dilutions

rickettsial species	RR				RS				RM				RF			
	No. seropositive (%)				No. seropositive (%)				No. seropositive (%)				No. seropositive (%)			
titre	differentiable	not differentiable	differentiable	not differentiable	differentiable	not differentiable	differentiable	not differentiable	differentiable	not differentiable	differentiable	not differentiable	differentiable	not differentiable	differentiable	not differentiable
1:128	1 (0.6%)	2 (2.9%)	5 (71.4%)	2 (4.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (100.0%)	0 (0.0%)
1:256	10 (6.1%)	5 (7.1%)	1 (14.3%)	3 (6.0%)	0 (0.0%)	1 (11.1%)	0 (0.0%)	1 (20.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (20.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
1:512	36 (21.8%)	12 (17.1%)	0 (0.0%)	9 (18.0%)	2 (50.0%)	2 (22.2%)	0 (0.0%)	1 (20.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (20.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
1:1024	86 (52.1%)	29 (41.4%)	0 (0.0%)	23 (46.0%)	1 (25.0%)	5 (55.5%)	0 (0.0%)	1 (20.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (20.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
1:2048	12 (7.3%)	9 (12.9%)	1 (14.3%)	6 (12.0%)	1 (25.0%)	1 (11.1%)	0 (0.0%)	1 (40.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (40.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
1:4096	20 (12.1%)	13 (18.6%)	0 (0.0%)	7 (14.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
No total	165	70	7	50	4	9	0	5	0	0	5	1	0	0	1	1

RH: *Rickettsia helvetica*, RR: *Rickettsia raoultii*, RS: *Rickettsia slovacica*, RM: *Rickettsia monacensis*, RF: *Rickettsia felis*

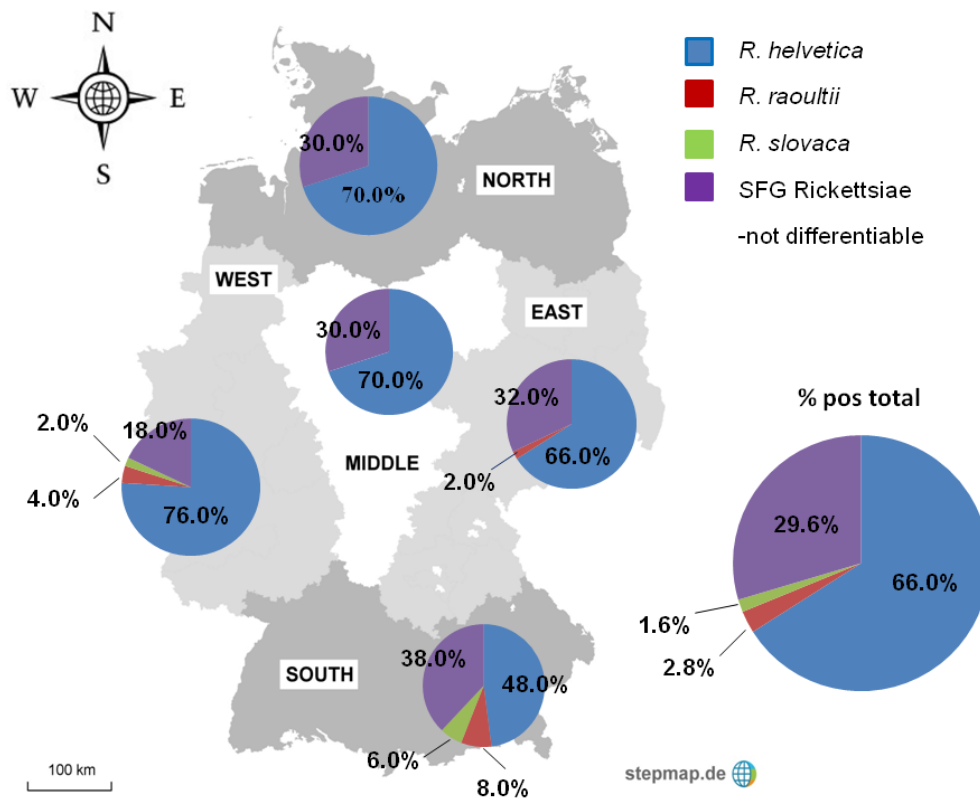


Figure 3 Division of Germany for sample assessment in five regions and seroprevalence rates of the tested *Rickettsia* spp. based on the 50 positive samples tested in the five different regions.

Discussion

Our study presents the first findings about serological differentiation of rickettsial species in dogs in Germany. The serological differentiation of antibodies against SFG Rickettsiae is difficult due to their strong cross reactivity [12]. The micro-IFA method has already been used by several authors to differentiate between antibodies against SFG-Rickettsiae. Breitschwerdt et al. (1987) used micro-IFA for a seroepidemiological study in dogs testing for *R. rickettsii*, *R. rhipicephali*, *R. montana* and *R. bellii* [44]. In Germany, nine different rickettsial antigens were investigated in hunters to differentiate antibodies against indigenous German SFG Rickettsiae as well as species endemic in regions where the hunters had travelled before [30]. The use of a micro-IFA method enables to a certain extent the differentiation of the antibodies leading to the most dominant serological response. However, a prerequisite is the knowledge of which Rickettsiae occur in

the investigated region [45]. We included antigens of SFG Rickettsiae that have been repeatedly detected in Germany and have been described to cause clinical manifestations. *R. massiliae* was not used because a single detection exclusively by molecular tools in Germany was described so far (Table 1) [7]. In this study we examined dogs as potential hosts for the *Rickettsia* species previously described in Germany and showed that, to a certain extent, it is serologically possible to distinguish between them. In 29.6% of the cases the detected antibodies were not differentiable and thus did not allow a clear species allocation. Some authors state that if two or more rickettsial species show distinct fluorescence at the end-titre they may be co-infectious rickettsial species [44, 46]. As dogs are more frequently exposed and infested with ticks and the pathogens they harbor than humans, dogs might likely be infected with more than one *Rickettsia* species sequentially during their lifetime, thus explaining the high percentage of not distinguishable seropositive animals (Wächter et al., Seroprevalence of Spotted Fever Group Rickettsiae in dogs in Germany, in press). For the major part (66%) of the samples at least twofold higher antibody titres against *R. helvetica* could be observed. These findings are consistent with the fact that the vector for *R. helvetica* is *Ixodes ricinus*, the most abundant tick species in Germany. Prevalence rates of *R. helvetica* in *I. ricinus* ticks were found in Bavaria, Baden-Württemberg, Berlin, Saarland, Lower Saxony and Saxony ranging from 3.5% up to 52.5% (Table 1). The lowest prevalence rates in ticks were found in southern Germany. Accordingly, the lowest seroprevalence rate was found in dogs originating from there. The highest prevalence rates were found in Lower Saxony, which is partly identical with the middle and northern region of Germany where high seroprevalence rates in dogs were found [7,38], (Table 3). Regarding the distribution of dogs with antibodies against *R. raoultii* and *R. slovaca* the distribution areas of the vectors have to be considered. So far, in Germany *R. raoultii* has only been detected in *Dermacentor reticulatus*, *R. slovaca* only in *D. marginatus* [28,39]. Spitalska et al. (2012) described in the Slovak Republic that *D. marginatus* and *D. reticulatus* could also be host for *R. raoultii* and *R. slovaca*, respectively [47]. However, comparing the geographic distribution in Germany for *D. reticulatus* and *D. marginatus* [48] with the distribution of seropositive dogs there is a partial concordance. The reason why the seroprevalence comparing the different regions is not statistically significant may be due to the fact that the number of cases were very small (Table 3). *R. monacensis* was detected in low

prevalences in ticks (0.2%-0.6%) nearly exclusively in Bavaria, only one study reported *R. monacensis* in ticks in Lower Saxony (Table 1). Regarding the dogs with cross-reactive antibodies against *R. monacensis*, these five dogs were nearly all located in the south of Germany. When comparing the vectors and their infection rates of *I. ricinus* for *R. helvetica* (3.5%-52.5%) and of the cat flea *Ctenocephalides felis* for *R. felis* (25.0%-56.0%) it may be surprising that the seroprevalence rate in dogs for *R. helvetica* is 66.0% and for *R. felis* is 0.0%. However, looking at the infestation of dogs with their vectors, a study about population dynamics of fleas in Germany showed that just 5.1% of the dogs are infested with fleas [49, 50]. We showed in our previous study that 91.1% of the examined dogs were infested with ticks up to five ticks/month, and 17.5% even up to 20 ticks/month (Wächter et al., Seroprevalence of Spotted Fever Group Rickettsiae in dogs in Germany, in press). Therefore infestation rates with ticks seem higher than with fleas which may lead to higher seroprevalence rates of *R. helvetica* compared to *R. felis* although the infection rates in the vector population are approximately even (Table 1), [50]. There were no dogs with antibodies exclusively against *R. felis*. The cross-reaction of *R. felis* with other members of the SFG is discussed controversially in the literature. The antibodies have been reported to show stronger reactivity to *R. typhi* from the Typhus Group than to members of the Spotted Fever Group [22,51-53]. Fang and Raoult (2003) described that mouse polyclonal antisera against *R. felis* only cross-reacted to members of the SFG Rickettsiae but not to the TG [54]. However, in contrast to the study of Fang and Raoult (2003), serum of a classical human case of murine typhus showed exclusive reactivity with TG-Rickettsiae and *R. felis* antigen but none with SFG-Rickettsiae. The same results were obtained when testing a commercially available positive anti-TG Rickettsia positive control (Fuller Laboratories, Fullerton, California, USA) (Wölfel et al., personal communication). In summary this indicates that *R. felis* might be the only SFG Rickettsia to show antigenic relation to the TG Rickettsiae, but can show reactivity to other SFG Rickettsia as well [55]. *R. felis* was the only antigen for which titres above 1:512 were not observed. However, it remains unclear, if the reactivity against several rickettsial antigens including *R. felis* was caused by multiple infections or by cross reaction. The serologic test systems micro-IFA and ELISA are used for seroepidemiologic surveys as well as diagnosing acute cases. The micro-IFA is the gold standard in human medicine, its sensitivity is indicated

with over 97%, its specificity with over 99% if a dilution of 1:64 or higher is used [7]. Clements et al. (1983) compared the two test systems for diagnosing Rocky Mountain Spotted Fever in humans and in this study the ELISA was as sensitive and as specific as the IFA [56]. Compared to the adapted micro-IFA test in this study the ELISA of the previous study had a moderate sensitivity (82.0%) and specificity (83.8%). These results are in line with non-published results of a comparable study with human sera. In that study, titres lower than 1:128 in an IFA could not be detected by ELISA (Dobler et al., personal communication). One reason for this reduced sensitivity might be that ELISA systems usually are designed for the clinical diagnosis of acute infections with high antibody titres instead of epidemiological studies (Dobler et al., personal communication). Lower antibody titres as expected after a longer post infection interval therefore might remain undetected by ELISA. The sensitivity of a serological assay also depends on the used antigen. In this case the ELISA used in the previous study was produced with *R. rickettsii* antigen, the causative agent of RMSF. Lower sensitivity and specificity rates for antibodies against other rickettsial species might be explained by that, as this *Rickettsia* species is not endemic in Germany. If no differentiation between rickettsial species is needed, ELISA assays might be reliable diagnostic tools for diagnosing acute cases where high antibody titres in sera can be expected and no differentiation between rickettsial species is needed. It is also a good screening tool for high numbers of samples, when the reduction of sensitivity is acceptable. The resulting seroprevalence rate then adds up all the rickettsial species occurring in the tested area. The micro-IFA on the other hand can be used to differentiate several rickettsial species and to determine the different antibody-titres, needed for example to monitor clinical cases.

Conclusion

This study reports the first results of a reliable serological test differentiating antibodies against rickettsial SFG species in dogs in Germany. The micro-IFA is a suitable tool for dogs to differentiate antibodies of the SFG Rickettsiae. Dogs are able to produce antibodies against SFG-Rickettsiae. The results reflect the natural exposure of dogs in Germany and could be related to the known infection rates in ticks. When compared to the micro-IFA the ELISA of the previous study showed acceptable sensitivity and specificity making both tests suitable for diagnostic

purposes. For epidemiological studies the IFA should be preferred due to its higher sensitivity and specificity.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

We thank the following persons for providing the blood samples: Prof. Dr. Ingo Nolte and Jan-Peter Bach, Small Animal Clinic, Foundation University of Veterinary Medicine, Hannover; Nicole Schulz, Department of Veterinary Clinical Sciences, Clinical Pathology and Clinical Pathophysiology, Justus-Liebig-University, Gießen; Anneliese Balling, Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, Leipzig; Aleksandra Chirek, Small Animal Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Berlin; Dr. Sabine Schall, Schifferstadt; Elisabeth Stemmler, Hohenwestedt, Veterinary clinic Dr. Stefan Reindl, Ingolstadt, veterinary practice Dr. Ebenboeck and colleagues, Traunstein, Dr. Uwe Urban, Amerang, Anuschka Winkelmann, St. Wolfgang, Johanna Gude, Eckental, Dr. Martin Steffl, University of Hohenheim, Stuttgart, Dr. Armin Reinle, Weil am Rhein, Veterinary clinic Neckarwiesen, Esslingen, Femke Mortier, Clinic of small animal medicine, Munich. Michael Leschnik, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria is acknowledged for providing the positive controls. The work of Martin Pfeffer and Cornelia Silaghi was done under the frame of EurNegVec COST Action TD1303. Finally we want to thank Bayer Vital GmbH for supporting Miriam Wächter with a grant. The paper has been sponsored by Bayer HealthCare – Animal Health Division in the framework of the 10th CVBD World Forum Symposium.

Authors' contributions

MW, SW and GD performed the laboratory analyses. CS and MP had the idea for the concept of the study. CS developed the experimental design. MW and CS analysed the data and wrote the manuscript. MP, SP and SW reviewed and critically corrected the manuscript. GD, BK, MP and AM provided study material.

All authors read and approved the final manuscript.

References

1. Parola P, Paddock CD, Raoult D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:719–56.
2. Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000;50(Pt 4):1449–55.
3. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, et al. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and ‘HGE agent’ as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51:2145–65.
4. Roux V, Rydkina E, Ereemeeva M, Raoult D. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the *rickettsiae*. *Int J Syst Bacteriol.* 1997;47:252–61.
5. Gillespie JJ, Beier MS, Rahman MS, Ammerman NC, Shallom JM, Purkayastha A, et al. Plasmids and rickettsial evolution: insight from *Rickettsia felis*. *PLoS One.* 2007;2:e266.
6. Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, et al. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26:657–702.
7. Dobler G, Wölfel R. Typhus and other rickettsioses: emerging infections in Germany. *Dtsch Arztebl Int.* 2009;106:348–54.
8. Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10:694–719.

9. Raoult D, Fournier PE, Fenollar F, Jensenius M, Prioe T, de Pina JJ, et al. *Rickettsia africae*, a tick-borne pathogen in travelers to sub-Saharan Africa. N Engl J Med. 2001;344:1504–10.
10. Fournier PE, Raoult D. Suicide PCR on skin biopsy specimens for diagnosis of rickettsioses. J Clin Microbiol. 2004;42:3428–34.
11. Jiang J, You BJ, Liu E, Apte A, Yarina TR, Myers TE, et al. Development of three quantitative real-time PCR assays for the detection of *Rickettsia raoultii*, *Rickettsia slovaca*, and *Rickettsia aeschlimannii* and their validation with ticks from the country of Georgia and the Republic of Azerbaijan. Ticks Tick Borne Dis. 2012;3:327–31.
12. Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, Birtles RJ, Bjoersdorff A, Blanco JR, et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. Clin Microbiol Infect. 2004;10:1108–32.
13. Teyssie N, Raoult D. Comparison of Western immunoblotting and microimmunofluorescence for diagnosis of Mediterranean spotted fever. J Clin Microbiol. 1992;30:455–60.
14. Nilsson K, Elfving K, Pahlson C. *Rickettsia helvetica* in patient with meningitis, Sweden, 2006. Emerg Infect Dis. 2010;16:490–2.
15. Nilsson K, Lindquist O, Pahlson C. Association of *Rickettsia helvetica* with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. Lancet. 1999;354:1169–73.
16. Fournier PE, Grunnenberger F, Jaulhac B, Gastinger G, Raoult D. Evidence of *Rickettsia helvetica* infection in humans, eastern France. Emerg Infect Dis. 2000;6:389–92.
17. Jado I, Oteo JA, Aldamiz M, Gil H, Escudero R, Ibarra V, et al. *Rickettsia monacensis* and human disease, Spain. Emerg Infect Dis. 2007;13:1405–7.
18. Madeddu G, Mancini F, Caddeo A, Ciervo A, Babudieri S, Maida I, et al. *Rickettsia monacensis* as cause of Mediterranean spotted fever-like illness, Italy. Emerg Infect Dis. 2012;18:702–4.
19. Vitale G, Mansuelo S, Rolain JM, Raoult D. *Rickettsia massiliae* human isolation. Emerg Infect Dis. 2006;12:174–5.

20. Parola P, Socolovschi C, Jeanjean L, Bitam I, Fournier PE, Sotto A, et al. Warmer weather linked to tick attack and emergence of severe rickettsioses. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2:e338.
21. Garcia-Garcia JC, Portillo A, Nunez MJ, Santibanez S, Castro B, Oteo JA. A patient from Argentina infected with *Rickettsia massiliae*. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82:691–2.
22. Schriefer ME, Sacci Jr JB, Dumler JS, Bullen MG, Azad AF. Identification of a novel rickettsial infection in a patient diagnosed with murine typhus. *J Clin Microbiol*. 1994;32:949–54.
23. Zavala-Velazquez JE, Ruiz-Sosa JA, Sanchez-Elias RA, Becerra-Carmona G, Walker DH. *Rickettsia felis* rickettsiosis in Yucatan. *Lancet*. 2000;356:1079–80.
24. Labruna MB, Walker DH. *Rickettsia felis* and changing paradigms about pathogenic rickettsiae. *Emerg Infect Dis*. 2014;20:1768–9.
25. Ibarra V, Oteo JA, Portillo A, Santibanez S, Blanco JR, Metola L, et al. *Rickettsia slovaca* infection: DEBONEL/TIBOLA. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1078:206–14.
26. Oteo JA, Ibarra V, Blanco JR, Martinez de Artola V, Marquez FJ, Portillo A, et al. Dermacentor-borne necrosis erythema and lymphadenopathy: clinical and epidemiological features of a new tick-borne disease. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10:327–31.
27. Rieg S, Schmoldt S, Theilacker C, de With K, Wolfel S, Kern WV, et al. Tick-borne lymphadenopathy (TIBOLA) acquired in Southwestern Germany. *BMC Infect Dis*. 2011;11:167.
28. Pluta S, Tewald F, Hartelt K, Oehme R, Kimmig P, Mackenstedt U. *Rickettsia slovaca* in *Dermacentor marginatus* ticks, Germany. *Emerg Infect Dis*. 2009;15:2077–8.
29. Richter J, Fournier PE, Petridou J, Haussinger D, Raoult D. *Rickettsia felis* infection acquired in Europe and documented by polymerase chain reaction. *Emerg Infect Dis*. 2002;8:207–8.

30. Jansen A, La Scola B, Raoult D, Lierz M, Wichmann O, Stark K, et al. Antibodies against *Rickettsia* spp. in hunters, Germany. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1961–3.
31. Piranda EM, Faccini JL, Pinter A, Saito TB, Pacheco RC, Hagiwara MK, Labruna MB: Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008, 103:696-701.
32. Solano-Gallego L, Kidd L, Trotta M, Di Marco M, Caldin M, Furlanello T, Breitschwerdt E: Febrile illness associated with *Rickettsia conorii* infection in dogs from Sicily. *Emerg Infect Dis* 2006, 12:1985-1988.
33. Hartelt K, Oehme R, Frank H, Brockmann SO, Hassler D, Kimmig P: Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia* sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany. *Int J Med Microbiol* 2004, 293 Suppl 37:86-92.
34. Wölfel R, Terzioglu R, Kiessling J, Wilhelm S, Essbauer S, Pfeffer M, Dobler G: *Rickettsia* spp. in *Ixodes ricinus* ticks in Bavaria, Germany. *Ann N Y Acad Sci* 2006, 1078:509-511.
35. Silaghi C, Gilles J, Höhle M, Pradel I, Just FT, Fingerle V, Kuchenhoff H, Pfister K: Prevalence of spotted fever group *rickettsiae* in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in southern Germany. *J Med Entomol* 2008, 45:948-955.
36. Schorn S, Pfister K, Reulen H, Mahling M, Silaghi C: Occurrence of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. *Parasit Vectors* 2011, 4:135.
37. Pichon B, Kahl O, Hammer B, Gray JS: Pathogens and host DNA in *Ixodes ricinus* nymphal ticks from a German forest. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2006, 6:382-387.
38. Schicht S, Schnieder T, Strube C: *Rickettsia* spp. and coinfections with other pathogenic microorganisms in hard ticks from northern Germany. *J Med Entomol* 2012, 49:766-771.
49. Silaghi C, Hamel D, Thiel C, Pfister K, Pfeffer M: Spotted fever group *rickettsiae* in ticks, Germany. *Emerg Infect Dis* 2011, 17:890-892.

40. Overzier E, Pfister K, Thiel C, Herb I, Mahling M, Silaghi C: Diversity of *Babesia* and *Rickettsia* Species in Questing *Ixodes ricinus*: A Longitudinal Study in Urban, Pasture, and Natural Habitats. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2013, 13:559-564.
41. May K, Strube C: Prevalence of *Rickettsiales* (*Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp.) in hard ticks (*Ixodes ricinus*) in the city of Hamburg, Germany. *Parasitol Res* 2014, 113:2169-2175.
42. Tappe J, Strube C: *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. infections in hard ticks (*Ixodes ricinus*) in the city of Hanover (Germany): revisited. *Ticks Tick Borne Dis* 2013, 4:432-438.
43. Pluta S, Hartelt K, Oehme R, Mackenstedt U, Kimmig P: Prevalence of *Coxiella burnetii* and *Rickettsia* spp. in ticks and rodents in southern Germany. *Ticks Tick Borne Dis* 2010, 1:145-147.
44. Breitschwerdt EB, Moncol DJ, Corbett WT, MacCormack JN, Burgdorfer W, Ford RB, Levy MG: Antibodies to spotted fever-group *rickettsiae* in dogs in North Carolina. *Am J Vet Res* 1987, 48:1436-1440.
45. La Scola B, Raoult D: Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J Clin Microbiol* 1997, 35:2715-2727.
46. Segura F, Pons I, Miret J, Pla J, Ortuno A, Nogueras MM: The role of cats in the eco-epidemiology of spotted fever group diseases. *Parasit Vectors* 2014, 7:353.
47. Spitalska E, Stefanidesova K, Kocianova E, Boldis V: *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia raoultii* in *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* ticks from Slovak Republic. *Exp Appl Acarol* 2012, 57:189-197.
48. Rubel F, Brugger K, Monazahian M, Habedank B, Dautel H, Leverenz S, Kahl O: The first German map of georeferenced ixodid tick locations. *Parasit Vectors* 2014, 7:477.
49. Mackensen H: Study about the population dynamics of fleas at dogs and cats in the area of Karlsruhe, Germany. Ludwig-Maximilians-University, Comparative Tropical Medicine and Parasitology; 2006.

50. Gilles J, Just FT, Silaghi C, Pradel I, Passos LM, Lengauer H, Hellmann K, Pfister K: *Rickettsia felis* in fleas, Germany. Emerg Infect Dis 2008, 14:1294-1296.
51. Williams M, Izzard L, Graves SR, Stenos J, Kelly JJ: First probable Australian cases of human infection with *Rickettsia felis* (cat-flea typhus). Med J Aust 2011, 194:41-43.
52. Abdad MY, Stenos J, Graves S: *Rickettsia felis*, an emerging flea-transmitted human pathogen. Emerg Health Threats J 2011, 4:7168.
53. Adams JR, Schmidtmann ET, Azad AF: Infection of colonized cat fleas, *Ctenocephalides felis* (Bouche), with a rickettsia-like microorganism. Am J Trop Med Hyg 1990, 43:400-409.
54. Fang R, Raoult D: Antigenic classification of *Rickettsia felis* by using monoclonal and polyclonal antibodies. Clin Diagn Lab Immunol 2003, 10:221-228.
55. Znazen A, Rolain JM, Hammami A, Jemaa MB, Raoult D: *Rickettsia felis* infection, Tunisia. Emerg Infect Dis 2006, 12:138-140.
56. Clements ML, Dumler JS, Fiset P, Wisseman CL, Jr., Snyder MJ, Levine MM: Serodiagnosis of Rocky Mountain spotted fever: comparison of IgM and IgG enzyme-linked immunosorbent assays and indirect fluorescent antibody test. J Infect Dis 1983, 148:876-880.

V. DISKUSSION

In der vorliegenden Studie wurden Serumproben von Hunden aus ganz Deutschland auf IgG-Antikörper gegen Rickettsien der SFG untersucht. Zusätzlich erfolgte eine Differenzierung der Antikörper mittels micro-IFA und eine Auswertung der Seropositivität hinsichtlich Parametern wie Alter, Geschlecht oder geographischer Verteilung.

Bei der Auswertung der prädisponierenden Faktoren gab es signifikante Unterschiede in der Höhe der Seroprävalenz in Abhängigkeit des Alters der Hunde. Je älter die Hunde waren, desto höher waren die Seroprävalenzen. Eine Erklärung könnte auf der einen Seite die jahrelange Persistenz der Antikörper (Tesouro et al., 1998), auf der anderen Seite eine mögliche kontinuierliche Reinfektion und die daraus folgende Boosterung derselbigen sein (Levin et al., 2014). Da über 90% der Hunde einem Zeckenbefall von bis zu 5 Zecken/Monat und mehr ausgesetzt waren (Publikation1, S.35ff.) und höchstwahrscheinlich häufiger im Leben von einer infizierten Zecke gestochen werden, scheint die immer wiederkehrende Boosterung der Antikörper die wahrscheinlichste Erklärung zu sein.

Statistisch signifikante Unterschiede zeigten sich auch bei der Seroprävalenz in Abhängigkeit vom Zeckenbefall der Hunde. Je höher der Zeckenbefall, desto höher waren auch die Seroprävalenzen. Auffallend war, dass 70% der Hunde bis zu fünf Zecken im Monat haben, über 16% der Hunde sogar zwischen fünf und zwanzig Zecken im Monat (Publikation1, S.35ff.). Betrachtet man die potentielle Reservoirfunktion des Hundes, die bei der Weiterverbreitung der Rickettsien eine wichtige Rolle spielt, kann an dieser Stelle sicherlich mit einer regelmäßigen, richtig angewendeten Zeckenprophylaxe einer Infektion mit Rickettsien sowie deren Verbreitung vorgebeugt werden.

Bei den Parametern Geschlecht und Rasse gab es keine signifikanten Unterschiede in den Seroprävalenzen. Dies deckt sich mit einer humanen Seroprävalenzstudie von Jansen et al. (2008), in der Seren von 286 Jägern auf Antikörper gegen die SFG untersucht wurden. Auch dort gab es hinsichtlich des Geschlechts der Untersuchten keine signifikanten Unterschiede.

Der Parameter Gesundheitszustand scheint keinen Einfluss auf die Seropositivität

zu haben. Allerdings muss einschränkend erwähnt werden, dass in dieser Studie nicht ausschließlich Hunde mit Verdacht auf eine Rickettsieninfektion getestet wurden. Auch wurden lediglich die Antikörper gegen die Rickettsien der SFG nachgewiesen, nicht der Erreger selbst. Eine Erkrankung mit einhergehender Krankheitssymptomatik in der Vergangenheit ist deswegen durchaus möglich. Um die Krankheitssymptomatik für mit den in Deutschland vorkommenden Rickettsienarten sicher beschreiben zu können, wären Infektionsstudien vonnöten. Es gibt bereits Studien über in Europa vorkommende Rickettsienarten wie *R. conorii*, die beim Hund meistens eine milde Fiebersymptomatik ausgelöst haben, oder bei denen die Hunde keinerlei Krankheitssymptome gezeigt haben (Alexandre et al., 2011). Auch einzelne Fallberichte über Infektionen mit *R. conorii*, die beim Hund schwerwiegendere Krankheitssymptome wie Erbrechen, Anorexie und intermittierende Lahmheit ausgelöst haben sind beschrieben (Solano-Gallego et al., 2006a).

Die geographische Verteilung der Hunde, die Antikörper gegen eine bestimmte Rickettsienart gebildet haben, spiegelt die geographische Verteilung der Vektoren der jeweiligen Rickettsienarten wieder.

Den größten Anteil der seropositiven Proben machten diejenigen mit Antikörpern gegen *R. helvetica* aus (66%), (Publikation2, S.45ff.). Die Prävalenzen in Zecken reichen von 3,5-52,5% (Tab. 1). Hier sind die niedrigsten Prävalenzen im südlichen Deutschland zu finden (3,5%) (Dobler and Wölfel, 2009), die höchsten in Niedersachsen und Hamburg (32,9-52,5%) (May and Strube, 2014; Schicht et al., 2012). Bei den Hunden waren die niedrigsten Seroprävalenzen ebenfalls im Süden von Deutschland zu finden (48%), die höchsten in Westen, Mitte und Norden von Deutschland (70-76%), (Publikation2, S.45ff.).

Die Seroprävalenzen in der untersuchten Hundepopulation auf *R. raoultii* und *R. slovaca* waren mit 2,8% bzw. 1,6% relativ gering (Publikation2, S. 45ff.) . Vergleicht man die geographische Verteilung der Herkunftsorte der seropositiven Hunde im Süden, Osten und Westen Deutschlands mit denen der Vektoren *D. marginatus* und *D. reticulatus* (Rubel et al., 2014) gibt es deutliche Überschneidungen der Gebiete.

Keine der Proben zeigte im Endtiter eine alleinige Fluoreszenz gegen *R. monacensis* oder *R. felis*. Bei *R. monacensis* mag es daran liegen, dass die

Prävalenzen in Zecken mit 0,2-4,4% ebenfalls sehr gering sind (Tab. 1). Betrachtet man die Serumproben bei denen *R. monacensis* im Endtiter zusammen mit anderen Rickettsienarten eine Fluoreszenz zeigt (Breitschwerdt et al., 1987; Segura et al., 2014), kann man einen Vergleich zwischen den *R. monacensis* seropositiven Hunden (Publikation2, S.45ff.) und der Verteilung der *R. monacensis* positiven Zecken (Tab. 1) ziehen. Sowohl die seropositiven Hunde als auch die auf *R. monacensis* positiv getesteten Zecken waren zum Großteil im Süden Deutschlands lokalisiert.

Bei *R. felis* muss in Betracht gezogen werden, dass nicht *I. ricinus* sondern *Ctenocephalides felis* der Hauptvektor für *R. felis* ist (Gilles et al., 2008). Vergleicht man nun die Prävalenzen von *R. felis* in *C. felis* (25,0-56,0%) und die Prävalenz von *R. helvetica* in *I. ricinus* (3,5-52,5%) mit deren Seroprävalenzen in Hunden (0,0% für *R. felis* bzw 66,0% für *R. helvetica*), gibt es trotz der nahezu gleichen Prävalenzen in den Hauptvektoren eine deutliche Diskrepanz in den Seroprävalenzen (Mackensen, 2006), (Tab. 1). Dies kommt möglicherweise daher, dass Hunde in Deutschland scheinbar deutlich häufiger mit Zecken (>90% haben bis zu fünf Zecken im Monat), als mit Flöhen befallen sind (5,1%) (Mackensen, 2006), (Publikation1, S.35ff.).

Die Differenzierung der IgG-Antikörper gegen SFG Rickettsien erfolgte mittels eines selbst hergestellten micro-IFA. Aufgrund der Kreuzreaktivität ist es mittels eines IFA mit nur einer Rickettsienart nicht möglich eine definitive Aussage über die antigenbildende Rickettsienart zu treffen. Ist aber bekannt welche Rickettsienarten in einer Region vorkommen, kann man alle Arten mittels eines micro-IFA mit demselben Serum testen und aufgrund des höheren Endtiters der verursachenden Rickettsienarten eine endgültige Aussage treffen (Brouqui et al., 2004; La Scola and Raoult, 1997). In dieser Studie wurden die Rickettsienarten *R. helvetica*, *R. raoultii*, *R. slovaca*, *R. monacensis* und *R. felis* verwendet. Diese Arten decken sich mit denen, die in Deutschland bereits aus Zecken isoliert wurden (Tab. 1). Da es von *R. massiliae* bisher nur eine einzige molekulare Detektion in Zecken in Deutschland gibt, wurde sie nicht in unseren micro-IFA mit einbezogen (Dobler and Wölfel, 2009). Die Technik des micro-IFA wurde schon in einigen früheren Studien zur Differenzierung der Antikörper verwendet. Breitschwerdt et al. (1987) untersuchten ebenfalls Hundeseren auf Antikörper gegen *R. rickettsii*, *R. rhipicephali*, *R. montana* und *R. bellii*. In der

Humanmedizin wird sowohl in Seroprävalenzstudien als auch in der Diagnostik mit dieser Technik gearbeitet (Jansen et al., 2008; Switaj et al., 2012). In 70,4% der untersuchten Serumproben gelang es, die Antikörper zu differenzieren und damit die infektiönsverursachende Rickettsienart zu benennen. In den restlichen 29,6% der Fälle war dies nicht möglich, da zwei oder mehr Rickettsienarten im Endtiter noch Fluoreszenz zeigten. Diese Situation wird von einigen Autoren als Co-Infektion durch mehrere Rickettsienarten bewertet (Breitschwerdt et al., 1987; Segura et al., 2014). Da Hunde, im Gegensatz zum Menschen, häufiger mit Zecken in Kontakt kommen, ist es auch durchaus möglich, dass sie im Laufe ihres Lebens eine Infektion mit verschiedenen Rickettsienarten nacheinander durchmachen, ohne dass diese notwendigerweise zur gleichen Zeit auftreten müssen. Dies würde den relativ hohen Anteil an nicht differenzierbaren Serumproben in der vorliegenden Studie erklären (Publikation2, S. 45ff.). Eine Sonderstellung kommt der Kreuzreaktivität von *R. felis* zu. Diese wird immer noch kontrovers diskutiert. Es wurde gezeigt, dass Antikörper eine stärkere Kreuzreaktivität mit *R. typhi* zeigen (Abdad et al., 2011; Adams et al., 1990; Schriefer et al., 1994; Williams et al., 2011). Fang und Raoult (2003) testeten die Reaktivität mit polyklonalem Mäuseserum; hier gab es lediglich eine Kreuzreaktivität mit Spezies der SFG, nicht aber der TG. Im Gegensatz zu dieser Studie zeigten humane Serumproben von einem Patienten mit murinem Typhus lediglich eine Reaktivität mit TG-Rickettsien und *R. felis*, ebenso verhielt es sich mit einer Positivkontrolle (anti-TG Rickettsia positive control; Fuller Laboratories, Fullerton, California, USA) (Wölfel et al., persönliche Mitteilung). In der vorliegenden Studie wurde in keiner Serumprobe eine positive Fluoreszenz über einem Titer von 1:512 gegen *R. felis* gefunden. Folglich kann man nicht sagen, ob die Fluoreszenz von der Kreuzreaktivität gegen andere SFG Rickettsienarten oder multipler Infektionen herrührt.

Die serologischen Tests wurden in der vorliegenden Studie sowohl mit einem kommerziell erhältlichen ELISA, als auch mit einem selbst hergestellten micro-IFA durchgeführt. In der Humanmedizin stellt der micro-IFA mit einer Sensitivität von über 97% und einer Spezifität über 99% den Goldstandard dar (Dobler and Wölfel, 2009). Clements et al. (1983) verglich die Testsysteme ELISA und micro-IFA anhand des RMSF; der ELISA war hier genauso sensitiv (100%) und spezifisch (100%) wie der micro-IFA (83-100%). In der hier

durchgeführten Studie zeigte der micro-IFA nur eine moderate Sensitivität (82,0%) und Spezifität (83,8%). Diese Ergebnisse decken sich mit denen einer unveröffentlichten Studie mit Humanseren. Dort zeigte sich, dass Titer unter 1:128 nicht vom ELISA angezeigt wurden (Dobler et al., persönliche Mitteilung). Eine Erklärung dafür kann in dem Verwendungszweck der kommerziell hergestellten ELISA-Testsysteme liegen. Diese wurden hauptsächlich für die Diagnose von akuten Erkrankungen konzipiert; hier kann man mit wesentlich höheren Antikörpertitern als in epidemiologischen Studien rechnen (Dobler et al., persönliche Mitteilung). Eine zweite Erklärung für die nur moderate Sensitivität des ELISA in unserer Studie ist möglicherweise das verwendete Antigen *R. rickettsii*. Diese Rickettsienart ist in Deutschland nicht endemisch und trotz der erwähnten Kreuzreaktivität zwischen Arten der SFG kann die Sensitivität deshalb herabgesetzt sein. Beide Testsysteme, ELISA und micro-IFA können zur serologischen Diagnostik verwendet werden. Der ELISA ist aufgrund der geringen Sensitivität im unteren Titerbereich eher zur Diagnostik von akuten Fällen geeignet. Voraussetzung ist, dass eine Differenzierung der Rickettsienart nicht gewünscht oder nötig ist und eine Zuordnung zu den Gruppen TG oder SFG ausreicht. Eine weitere Verwendung liegt im Screening einer hohen Anzahl von Proben, bei denen der Sensitivitätsverlust akzeptabel ist. Der micro-IFA ist bei Hunden mit Einschränkung, beim Menschen uneingeschränkt zur Artendifferenzierung zu empfehlen (Brouqui et al., 2004). Ebenso kann er zur Verlaufstestung in klinischen Fällen, bei denen der Titer regelmäßig kontrolliert wird, verwendet werden (Dobler et al., persönliche Mitteilung). Auch für epidemiologische Studien ist der micro-IFA aufgrund der höheren Sensitivität die beste Möglichkeit der serologischen Diagnostik. Möglicherweise könnte in Zukunft eine Weiterentwicklung des ELISA seine Sensitivität und Spezifität erhöhen, so dass eine Speziesdifferenzierung möglich ist. Eine Studie von Do et al. (2009) untersuchte Spezifität und Sensitivität von einem *R. conorii* ELISA der mit rekombinanten Proteinen (OmpA und OmpB) arbeitet. Bei der Verwendung von OmpA lag die Spezifität bei 100%, die Sensitivität bei 90%, bei der Verwendung von OmpB lag die Spezifität bei 95% und 100%, die Sensitivität bei 95% und 90%. Weitere Studien mit rekombinanten Proteinen verschiedener Rickettsienarten sind vonnöten, um die Technik zu optimieren und möglicherweise ein marktfähiges Produkt zu entwickeln.

VI. SCHLUSSFOLGERUNG

Diese Studie berichtet über die ersten Ergebnisse einer serologischen Untersuchung zu Rickettsien der SFG bei Hunden in Deutschland.

Die hohe Gesamtseroprävalenz von Antikörpern gegen Rickettsien der SFG in den untersuchten Hunden (77,9%-93,9%) und die fehlenden Unterschiede in der geographischen Verteilung lassen die Schlussfolgerung zu, dass ganz Deutschland als endemisches Gebiet für Rickettsien bewertet werden kann.

Die Differenzierung der Antikörper innerhalb der SFG spiegelte bis zu einem gewissen Grad die Verteilung der in Deutschland vorkommenden Rickettsien in ihren Vektoren wider.

Zum Nachweis von Antikörpern gegen Rickettsien der SFG können je nach Fragestellung sowohl der ELISA als auch der micro-IFA Verwendung finden. Für epidemiologische Studien sollte der micro-IFA aufgrund seiner höheren Sensitivität und Spezifität bevorzugt verwendet werden.

Aufgrund der teilweise hohen Prävalenzzahlen in Zecken und der sehr hohen Seroprävalenzen in Hundeseren sollte die Rickettsiose häufiger auf der Differentialdiagnosenliste der Humanmediziner stehen. Dem Hund könnte daher als Sentineltier für humane Infektionen eine bedeutende Rolle zukommen, seine Rolle als Reserviertier ist jedoch durch weitere Studien zu festigen. Bei Fällen von unklarem Fieber nach Zeckenstich könnte eine Infektion mit Rickettsien auch beim Hund in Deutschland eine Rolle spielen.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Der Hund steht im Zusammenhang mit zeckenübertragenen Erkrankungen immer wieder als Reservoir- und Sentineltier im Fokus der Forschung. Bisher gab es keinerlei Seroprävalenzdaten über die durch Zecken übertragenen Rickettsien der Spotted Fever Group (SFG) beim Hund in Deutschland.

Deswegen wurden in dieser Studie Hunde aus ganz Deutschland auf Antikörper gegen die SFG Rickettsien getestet. Einschlusskriterien waren: die Hunde (i) mussten in Deutschland geboren sein, (ii) durften Deutschland zeitlebens nie verlassen haben, (iii) mussten aus einem anderen Grund als der Studie eine Blutentnahme haben und (iv) Minimaldaten (Datum der Blutentnahme, Geschlecht, Alter, Rasse, Herkunftsort, Gesundheitszustand (gesund, krank) und Zeckenbefall) mussten vorhanden sein. Es wurden 605 Serum- und 301 Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Proben von Hunden ($n = 605$) im Zeitraum von August 2012 – Januar 2014 gesammelt. Aus den EDTA-Proben wurden zur Untersuchung auf Blutparasiten Giemsa-gefärbte Blutaussstriche und Buffy Coats angefertigt. Die Serumproben wurden mittels eines kommerziell erhältlichen Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Canine Spotted Fever Rickettsia EIA IgG Antibody Kit, Fuller Laboratories, Fullerton, California, USA) auf ImmunglobulinG (IgG)-Antikörper gegen die SFG Rickettsien getestet. Zur Differenzierung der Antikörper gegen die SFG Rickettsien wurde ein micro-immunofluorescence assay (micro-IFA) mit den in Deutschland vorkommenden Rickettsienarten *R. helvetica*, *R. raoultii*, *R. slovaca*, *R. monacensis* und *R. felis* hergestellt. Die Serumproben wurden bei einem Titer von 1:128 gescreent und je 50 zufällig ausgewählte seropositive Proben aus fünf verschiedenen Regionen Deutschlands wurden zur Identifizierung der verursachenden Rickettsienart austitriert. Die im Endtiter fluoreszierende Rickettsienart wurde als die antikörperproduzierende Rickettsienart eingestuft. Die beiden Testsysteme ELISA und micro-IFA wurden verglichen, um deren Zuverlässigkeit und Verwendung in der Diagnostik zu eruieren. Die statistischen Berechnungen wurden mit SPSS® version 21.0.1., SPSS Inc., Chicago, IL, USA durchgeführt. Die exakten Konfidenzintervalle (CI 95%) der Prävalenzen wurden mit der Clopper und Pearson Methode berechnet (Clopper and Pearson, 1934). Die Korrelationen zwischen Alter, Geschlecht, Rasse, Region, Zeckenbefall, Gesundheitszustand

und seropositiven Hunden wurde mit dem χ^2 -Test und bei kleinen Proben mit dem exakten Test nach Fisher berechnet. Statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ angenommen und für multiple Vergleiche mit der Bonferroni-Korrektur angepasst. Beim Vergleich der Testsysteme ELISA und micro-IFA wurden die Sensitivität bzw. Spezifität des ELISA wie folgt berechnet: Sensitivität (true positive rate = TPR) = TP (true positive)/ P (positive); Spezifität (SPC, true negative rate) = TN (true negative)/ N (negative).

Der ELISA ergab eine Seroprävalenz von 77,9%. Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich regionaler Verteilung, Geschlecht oder Rasse. Die Seroprävalenz stieg statistisch signifikant mit dem Alter der Hunde und der Befallsintensität mit Zecken an. Beim micro-IFA ergab sich eine Seroprävalenz von 93,9%, bei der Differenzierung der Antikörper fiel ein Anteil von 66,0% auf *R. helvetica*, 2,8% auf *R. raoultii* und 1,6% auf *R. slovaca*; 29,6% der Antikörper konnten nicht differenziert werden. Auch im Hinblick auf die einzelnen Rickettsienarten gab es bezüglich der regionalen Verteilung keine statistisch signifikanten Unterschiede. Beim Vergleich der beiden Testsysteme erreichte der ELISA eine Sensitivität von 82,0% und eine Spezifität von 83,8%.

Die vorliegende Studie zeigt, dass Hunde Antikörper gegen in Deutschland vorkommende Rickettsienarten der SFG bilden können. Betrachtet man die Rolle des Hundes als Sentineltier, kann Deutschland als endemisches Gebiet für Rickettsien der SFG eingestuft werden. Gleichzeitig besteht für den Menschen ein Risiko mit einer in Deutschland vorkommenden Rickettsienart infiziert zu werden und eventuell daran zu erkranken. Die geographische Verteilung der einzelnen Rickettsienarten kann mit der Verteilung der jeweiligen Vektoren assoziiert werden. Der Hund kann somit als Sentineltier eine wichtige Rolle bei der Überwachung der Ausbreitung der Rickettsiosen spielen, seine Rolle als Reserviertier ist jedoch durch weitere Studien zu festigen. Der ELISA ist als serologische Methode für die Diagnostik von akuten Erkrankungen oder dem Screening einer großen Menge von Proben geeignet; für epidemiologische Studien, diagnostische Verlaufskontrollen und falls eine Artendifferenzierung gewünscht ist, ist der micro-IFA die bessere Wahl.

Rickettsiosen werden vermutlich auch in Deutschland eine zunehmend wichtige Rolle in der Humanmedizin spielen. Die klinische Symptomatik für die Spezies Hund muss noch durch Infektionsversuche genauer geprüft werden.

VIII. SUMMARY

The dog and its role as a sentinel and reservoir is always an important topic of research in tick-borne diseases. Up to date there is no data available about seroprevalences of SFG Rickettsiae in dogs in Germany.

In this study dogs from all over Germany were tested for antibodies against the SFG Rickettsiae. Inclusion criteria for the dogs to enter the study were (i) Germany as the place of birth, (ii) never having left Germany in their lifetime, (iii) reason of blood collection another than the study and (iv) presence of the minimal data. The minimal data for each dog were collected with a questionnaire for the owner and included data on blood collection, sex, age, breed, location, clinical state (healthy or sick) and tick infestation. Altogether, 605 serum samples and 301 EDTA-samples of dogs (n=605) from all areas of Germany were collected from August 2012 - January 2014. Blood and buffy coat smears were made out of the EDTA-samples, stained with Giemsa and screened microscopically for blood parasites. Each serum sample was tested for the presence of IgG-antibodies against SFGR with a commercial ELISA according to the manufacturer's instructions (Canine Spotted Fever Rickettsia EIA IgG Antibody Kit, Fuller Laboratories, Fullerton, California, USA). After processing the ELISA all sera were screened in a dilution of 1:128 with a homemade micro-IFA using *R. helvetica*, *R. raoultii*, *R. slovaca*, *R. monacensis* and *R. felis*. Fifty seropositive samples out of every region (in total 250 serum samples) were titrated to an end point to differentiate the antibodies of the different rickettsial species from each other. Afterwards the two test systems ELISA and micro-IFA were compared to each other to evaluate the two test systems regarding reliability and type of use. Statistical analyses were done with SPSS® version 21.0.1., SPSS Inc., Chicago, IL, USA. Confidence intervals (CI) were calculated individually for each proportion with the Clopper and Pearson method (Clopper and Pearson, 1934). Correlations between age, sex, breed, location, tick infestation, clinical state and seropositivity were compared with the χ^2 -test and for small sample sizes with the Fisher's exact test. Statistical significance was considered at a p-value <0.05 and corrected for multiple comparisons with the Bonferroni adjustment. Sensitivity and specificity of the ELISA was calculated as follows: Sensitivity (true positive rate = TPR) = TP (true positive)/ P (positive) and specificity (SPC, true negative

rate) = TN (true negative)/ N (negative).

Testing with the ELISA revealed a seroprevalence of 77.9%. There were no statistic significant differences between location, sex, breed and seropositivity. Seropositivity was statistically significantly correlated with age and tick infestation. Screening with the micro-IFA revealed a seroprevalence of 93.9%; 66% of the serum samples were positive for *R. helvetica*, 2.8% for *R. raoultii* and 1.6 % for *R. slovaca*. 29.6 % of the serum samples were not differentiable. Regarding the different rickettsial species, no statistically significant differences were observed either regarding the location. Within the comparison of the two test systems the ELISA showed a sensitivity of 82.0 % and a specificity of 83.8 %

In this study we showed that dogs are able to produce antibodies against the SFG Rickettsiae occurring in Germany. Assuming the dog as a sentinel, Germany can be indicated as an endemic area for SFG Rickettsiae. Concurrently there is a considerable risk for humans to get infected and perhaps develop symptoms of rickettsioses with the occurring rickettsial species. The geographic distribution of the dogs which were seropositive for the different rickettsial species, can be related to the distribution of their vectors. The dog may play an important role as a sentinel, but its role as a reservoir should be evaluated in further studies. ELISA assays might be a reliable diagnostic tool for diagnosing acute cases and screening for high numbers of samples. For epidemiological studies, monitoring clinical cases and to differentiate the antibodies of the rickettsial species the micro-IFA should be preferred.

Rickettsioses will probably play an emerging role in human medicine in Germany in the future. Further infection studies are needed to concretize the clinical symptoms for the species dog.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

Abdad, M.Y., Stenos, J., Graves, S., 2011. *Rickettsia felis*, an emerging flea-transmitted human pathogen. *Emerging health threats journal* 4, 7168.

Adams, J.R., Schmidtman, E.T., Azad, A.F., 1990. Infection of colonized cat fleas, *Ctenocephalides felis* (Bouche), with a rickettsia-like microorganism. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 43, 400-409.

Alexandre, N., Santos, A.S., Bacellar, F., Boinas, F.J., Nuncio, M.S., de Sousa, R., 2011. Detection of *Rickettsia conorii* strains in Portuguese dogs (*Canis familiaris*). *Ticks and tick-borne diseases* 2, 119-122.

Amusategui, I., Tesouro, M.A., Kakoma, I., Sainz, A., 2008. Serological reactivity to *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Neorickettsia risticii*, *Borrelia burgdorferi* and *Rickettsia conorii* in dogs from northwestern Spain. *Vector borne and zoonotic diseases* 8, 797-803.

Azad, A.F., Sacci, J.B., Jr., Nelson, W.M., Dasch, G.A., Schmidtman, E.T., Carl, M., 1992. Genetic characterization and transovarial transmission of a typhus-like *rickettsia* found in cat fleas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 43-46.

Beati, L., Peter, O., Burgdorfer, W., Aeschlimann, A., Raoult, D., 1993. Confirmation that *Rickettsia helvetica* sp. nov. is a distinct species of the spotted fever group of rickettsiae. *International journal of systematic bacteriology* 43, 521-526.

Blanco, J.R., Oteo, J.A., 2006. Rickettsiosis in Europe. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1078, 26-33.

Bouyer, D.H., Stenos, J., Crocquet-Valdes, P., Moron, C.G., Popov, V.L., Zavala-Velazquez, J.E., Foil, L.D., Stothard, D.R., Azad, A.F., Walker, D.H., 2001. *Rickettsia felis*: molecular characterization of a new member of the spotted fever group. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 51, 339-347.

Breitschwerdt, E.B., Moncol, D.J., Corbett, W.T., MacCormack, J.N., Burgdorfer,

W., Ford, R.B., Levy, M.G., 1987. Antibodies to spotted fever-group rickettsiae in dogs in North Carolina. *American journal of veterinary research* 48, 1436-1440.

Brouqui, P., Bacellar, F., Baranton, G., Birtles, R.J., Bjoersdorff, A., Blanco, J.R., Caruso, G., Cinco, M., Fournier, P.E., Francavilla, E., Jensenius, M., Kazar, J., Laferl, H., Lakos, A., Lotric Furlan, S., Maurin, M., Oteo, J.A., Parola, P., Perez-Eid, C., Peter, O., Postic, D., Raoult, D., Tellez, A., Tselentis, Y., Wilske, B., 2004. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 10, 1108-1132.

Burgdorfer, W., Aeschlimann, A., Peter, O., Hayes, S.F., Philip, R.N., 1979. *Ixodes ricinus*: vector of a hitherto undescribed spotted fever group agent in Switzerland. *Acta tropica* 36, 357-367.

Clements, M.L., Dumler, J.S., Fiset, P., Wisseman, C.L., Jr., Snyder, M.J., Levine, M.M., 1983. Serodiagnosis of Rocky Mountain spotted fever: comparison of IgM and IgG enzyme-linked immunosorbent assays and indirect fluorescent antibody test. *The Journal of infectious diseases* 148, 876-880.

Clopper, C.J., Pearson, E.S., 1934. The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial. *Biometrika* 26, 404-413.

Daiter, A.B., 1960. [The bedbug as a possible reservoir of *Rickettsia burneti*. (Experimental and epidemiological data)]. *Voprosy virusologii* 6, 591-598.

Demma, L.J., Traeger, M., Blau, D., Gordon, R., Johnson, B., Dickson, J., Ethelbah, R., Piontkowski, S., Levy, C., Nicholson, W.L., Duncan, C., Heath, K., Cheek, J., Swerdlow, D.L., McQuiston, J.H., 2006. Serologic evidence for exposure to *Rickettsia rickettsii* in eastern Arizona and recent emergence of Rocky Mountain spotted fever in this region. *Vector borne and zoonotic diseases* 6, 423-429.

Denison, A.M., Amin, B.D., Nicholson, W.L., Paddock, C.D., 2014. Detection of *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, and *Rickettsia akari* in skin biopsy specimens using a multiplex real-time polymerase chain reaction assay. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 59, 635-642.

- Deplazes, P., Eckert, J., von Samson-Himmelstjerna, G., Zahner, H., 2012. Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin, 3 Edition. Enke Verlag, 639 p.
- Do, E.J., Kim, J.E., Park, J.M., Lee, K.M., Jung, M.Y., Lee, H.J., Cho, H.W., Choi, Y.J., Lee, S.H., Park, K.H., Jang, W.J., 2009. Development of recombinant OmpA and OmpB proteins as diagnostic antigens for rickettsial disease. *Microbiology and immunology* 53, 368-374.
- Dobler, G., Essbauer, S., Wolfel, R., 2009. Isolation and preliminary characterisation of '*Rickettsia monacensis*' in south-eastern Germany. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 15 Suppl 2, 263-264.
- Dobler, G., Pfeffer, M., 2012. Spotted Fever Rickettsiae and Rickettsioses in Germany, In: Mehlhorn, H. (Ed.) *Arthropods as Vectors of Emerging Disease (Parasitology Research Monographs)*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Dobler, G., Wölfel, R., 2009. Typhus and other rickettsioses: emerging infections in Germany. *Deutsches Arzteblatt international* 106, 348-354.
- Duh, D., Punda-Polic, V., Avsic-Zupanc, T., Bouyer, D., Walker, D.H., Popov, V.L., Jelovsek, M., Gracner, M., Trilar, T., Bradaric, N., Kurtti, T.J., Strus, J., 2010. *Rickettsia hoogstraalii* sp. nov., isolated from hard- and soft-bodied ticks. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 60, 977-984.
- Duh, D., Punda-Polic, V., Trilar, T., Petrovec, M., Bradaric, N., Avsic-Zupanc, T., 2006. Molecular identification of *Rickettsia felis*-like bacteria in *Haemaphysalis sulcata* ticks collected from domestic animals in southern Croatia. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1078, 347-351.
- Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y., Rurangirwa, F.R., 2001. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 51, 2145-2165.

Elfving, K., Lindblom, A., Nilsson, K., 2008. Seroprevalence of *Rickettsia* spp. infection among tick-bitten patients and blood donors in Sweden. Scandinavian journal of infectious diseases 40, 74-77.

Elfving, K., Lukinius, A., Nilsson, K., 2012. Life cycle, growth characteristics and host cell response of *Rickettsia helvetica* in a Vero cell line. Experimental & applied acarology 56, 179-187.

Eshoo, M.W., Crowder, C.D., Carolan, H.E., Rounds, M.A., Ecker, D.J., Haag, H., Mothes, B., Nolte, O., 2014. Broad-range survey of tick-borne pathogens in Southern Germany reveals a high prevalence of *Babesia microti* and a diversity of other tick-borne pathogens. Vector borne and zoonotic diseases 14, 584-591.

Fang, R., Raoult, D., 2003. Antigenic classification of *Rickettsia felis* by using monoclonal and polyclonal antibodies. Clinical and diagnostic laboratory immunology 10, 221-228.

Feng, W.C., Murray, E.S., Rosenberg, G.E., Spielman, J.M., Waner, J.L., 1979. Natural infection of dogs on Cape Cod with *Rickettsia rickettsii*. Journal of clinical microbiology 10, 322-325.

Fischer, M. 2012. Rickettsiosen (<http://www.wehrmed.de/article/2202-RICKETTSIOSEN.html>).

Fournier, P.E., Raoult, D., 2004. Suicide PCR on skin biopsy specimens for diagnosis of rickettsioses. Journal of clinical microbiology 42, 3428-3434.

Friedman, C.S., Andree, K.B., Beauchamp, K.A., Moore, J.D., Robbins, T.T., Shields, J.D., Hedrick, R.P., 2000. '*Candidatus Xenohaliotis californiensis*', a newly described pathogen of abalone, *Haliotis* spp., along the west coast of North America. International journal of systematic and evolutionary microbiology 50 Pt 2, 847-855.

Furuya, Y., Yamamoto, S., Otu, M., Yoshida, Y., Ohashi, N., Murata, M., Kawabata, N., Tamura, A., Kawamura, A., Jr., 1991. Use of monoclonal antibodies against *Rickettsia tsutsugamushi* Kawasaki for serodiagnosis by enzyme-linked immunosorbent assay. Journal of clinical microbiology 29, 340-345.

Gilles, J., Just, F.T., Silaghi, C., Pradel, I., Passos, L.M., Lengauer, H., Hellmann, K., Pfister, K., 2008. *Rickettsia felis* in fleas, Germany. Emerging infectious diseases 14, 1294-1296.

Gillespie, J.J., Beier, M.S., Rahman, M.S., Ammerman, N.C., Shallom, J.M., Purkayastha, A., Sobral, B.S., Azad, A.F., 2007. Plasmids and rickettsial evolution: insight from *Rickettsia felis*. PloS one 2, e266.

Giroud, P., Le Gac, P., Dumas, N., Colas-Belcour, J., 1959. [The hedgehog *Erinaceus europaeus*, reservoir of *Rickettsia* or of neo-*rickettsia* and even of agents of the ovine abortion group]. Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales 52, 726-730.

Harrus, S., Lior, Y., Ephros, M., Grisaru-Soen, G., Keysary, A., Strenger, C., Jongejan, F., Waner, T., Baneth, G., 2007. *Rickettsia conorii* in humans and dogs: a seroepidemiologic survey of two rural villages in Israel. The American journal of tropical medicine and hygiene 77, 133-135.

Hartelt, K., Oehme, R., Frank, H., Brockmann, S.O., Hassler, D., Kimmig, P., 2004. Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia* sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany. International journal of medical microbiology : IJMM 293 Suppl 37, 86-92.

Haydon, D.T., Cleaveland, S., Taylor, L.H., Laurenson, M.K., 2002. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. Emerging infectious diseases 8, 1468-1473.

Hayes, S.F., Burgdorfer, W., Aeschlimann, A., 1980. Sexual transmission of spotted fever group rickettsiae by infected male ticks: detection of rickettsiae in immature spermatozoa of *Ixodes ricinus*. Infection and immunity 27, 638-642.

Heyman, P., Cochez, C., Hofhuis, A., van der Giessen, J., Sprong, H., Porter, S.R., Losson, B., Saegerman, C., Donoso-Mantke, O., Niedrig, M., Papa, A., 2010. A clear and present danger: tick-borne diseases in Europe. Expert review of anti-infective therapy 8, 33-50.

Hii, S.F., Abdad, M.Y., Kopp, S.R., Stenos, J., Rees, R.L., Traub, R.J., 2013.

Seroprevalence and risk factors for *Rickettsia felis* exposure in dogs from Southeast Queensland and the Northern Territory, Australia. *Parasites & vectors* 6, 159.

Hornok, S., Kovats, D., Csorgo, T., Meli, M.L., Gonczi, E., Hadnagy, Z., Takacs, N., Farkas, R., Hofmann-Lehmann, R., 2014. Birds as potential reservoirs of tick-borne pathogens: first evidence of bacteraemia with *Rickettsia helvetica*. *Parasites & vectors* 7, 128.

Ibarra, V., Oteo, J.A., Portillo, A., Santibanez, S., Blanco, J.R., Metola, L., Eiros, J.M., Perez-Martinez, L., Sanz, M., 2006. *Rickettsia slovaca* infection: DEBONEL/TIBOLA. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1078, 206-214.

Izzard, L., Cox, E., Stenos, J., Waterston, M., Fenwick, S., Graves, S., 2010. Serological prevalence study of exposure of cats and dogs in Launceston, Tasmania, Australia to spotted fever group rickettsiae. *Australian veterinary journal* 88, 29-31.

Jado, I., Oteo, J.A., Aldamiz, M., Gil, H., Escudero, R., Ibarra, V., Portu, J., Portillo, A., Lezaun, M.J., Garcia-Amil, C., Rodriguez-Moreno, I., Anda, P., 2007. *Rickettsia monacensis* and human disease, Spain. *Emerging infectious diseases* 13, 1405-1407.

Jansen, A., La Scola, B., Raoult, D., Lierz, M., Wichmann, O., Stark, K., Schneider, T., 2008. Antibodies against *Rickettsia* spp. in hunters, Germany. *Emerging infectious diseases* 14, 1961-1963.

Kawahara, M., Rikihisa, Y., Isogai, E., Takahashi, M., Misumi, H., Suto, C., Shibata, S., Zhang, C., Tsuji, M., 2004. Ultrastructure and phylogenetic analysis of '*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*' in the family *Anaplasmataceae*, isolated from wild rats and found in *Ixodes ovatus* ticks. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 54, 1837-1843.

La Scola, B., Raoult, D., 1997. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *Journal of clinical microbiology* 35, 2715-2727.

Levin, M.L., Killmaster, L.F., Zemtsova, G.E., 2012. Domestic dogs (*Canis familiaris*) as reservoir hosts for *Rickettsia conorii*. Vector borne and zoonotic diseases 12, 28-33.

Levin, M.L., Zemtsova, G.E., Montgomery, M., Killmaster, L.F., 2014. Effects of homologous and heterologous immunization on the reservoir competence of domestic dogs for *Rickettsia conorii (israelensis)*. Ticks and tick-borne diseases 5, 33-40.

Lledo, L., Dominguez-Penafiel, G., Gimenez-Pardo, C., Gegundez, I., Gonzalez, R., Saz, J.V., 2014. Molecular and serological study of rickettsial infection in humans, and in wild and farm animals, in the province of Burgos, Spain. Vector borne and zoonotic diseases 14, 383-388.

Mackensen, H., 2006. Study about the population dynamics of fleas at dogs and cats in the area of Karlsruhe, Germany. Ludwig-Maximilians-University, Munich.

Madeddu, G., Mancini, F., Caddeo, A., Ciervo, A., Babudieri, S., Maida, I., Fiori, M.L., Rezza, G., Mura, M.S., 2012. *Rickettsia monacensis* as cause of Mediterranean spotted fever-like illness, Italy. Emerging infectious diseases 18, 702-704.

May, K., Strube, C., 2014. Prevalence of *Rickettsiales* (*Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp.) in hard ticks (*Ixodes ricinus*) in the city of Hamburg, Germany. Parasitology research 113, 2169-2175.

McQuiston, J.H., Guerra, M.A., Watts, M.R., Lawaczeck, E., Levy, C., Nicholson, W.L., Adjemian, J., Swerdlow, D.L., 2011. Evidence of exposure to spotted fever group rickettsiae among Arizona dogs outside a previously documented outbreak area. Zoonoses and public health 58, 85-92.

Mediannikov, O., Matsumoto, K., Samoylenko, I., Drancourt, M., Roux, V., Rydkina, E., Davoust, B., Tarasevich, I., Brouqui, P., Fournier, P.E., 2008. *Rickettsia raoultii* sp. nov., a spotted fever group rickettsia associated with *Dermacentor* ticks in Europe and Russia. International journal of systematic and evolutionary microbiology 58, 1635-1639.

Nilsson, K., Lindquist, O., Pahlson, C., 1999. Association of *Rickettsia helvetica*

with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. *Lancet* 354, 1169-1173.

Oteo, J.A., Ibarra, V., Blanco, J.R., Martinez de Artola, V., Marquez, F.J., Portillo, A., Raoult, D., Anda, P., 2004. *Dermacentor*-borne necrosis erythema and lymphadenopathy: clinical and epidemiological features of a new tick-borne disease. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 10, 327-331.

Oteo, J.A., Portillo, A., 2012. Tick-borne rickettsioses in Europe. *Ticks and tick-borne diseases* 3, 271-278.

Overzier, E., Pfister, K., Herb, I., Mahling, M., Bock, G., Jr., Silaghi, C., 2013a. Detection of tick-borne pathogens in roe deer (*Capreolus capreolus*), in questing ticks (*Ixodes ricinus*), and in ticks infesting roe deer in southern Germany. *Ticks and tick-borne diseases* 4, 320-328.

Overzier, E., Pfister, K., Thiel, C., Herb, I., Mahling, M., Silaghi, C., 2013b. Diversity of *Babesia* and *Rickettsia* Species in Questing *Ixodes ricinus*: A Longitudinal Study in Urban, Pasture, and Natural Habitats. *Vector borne and zoonotic diseases* 13, 559-564.

Paddock, C.D., Brenner, O., Vaid, C., Boyd, D.B., Berg, J.M., Joseph, R.J., Zaki, S.R., Childs, J.E., 2002. Short report: concurrent Rocky Mountain spotted fever in a dog and its owner. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 66, 197-199.

Parola, P., Paddock, C.D., Raoult, D., 2005. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clinical microbiology reviews* 18, 719-756.

Parola, P., Paddock, C.D., Socolovschi, C., Labruna, M.B., Mediannikov, O., Kernif, T., Abdad, M.Y., Stenos, J., Bitam, I., Fournier, P.E., Raoult, D., 2013. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clinical microbiology reviews* 26, 657-702.

Parola, P., Raoult, D., 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 32, 897-928.

- Parola, P., Rovero, C., Rolain, J.M., Brouqui, P., Davoust, B., Raoult, D., 2009. *Rickettsia slovaca* and *R. raoultii* in tick-borne Rickettsioses. Emerging infectious diseases 15, 1105-1108.
- Philip, C.B., Parker, R.R., 1933. Rocky Mountain spotted fever. Investigation of sexual transmission in the wood tick *Dermacentor andersoni*. Public Health Rep. 48, 266-272.
- Pichon, B., Kahl, O., Hammer, B., Gray, J.S., 2006. Pathogens and host DNA in *Ixodes ricinus* nymphal ticks from a German forest. Vector borne and zoonotic diseases 6, 382-387.
- Piranda, E.M., Faccini, J.L., Pinter, A., Saito, T.B., Pacheco, R.C., Hagiwara, M.K., Labruna, M.B., 2008. Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 103, 696-701.
- Pluta, S., Hartelt, K., Oehme, R., Mackenstedt, U., Kimmig, P., 2010. Prevalence of *Coxiella burnetii* and *Rickettsia* spp. in ticks and rodents in southern Germany. Ticks and tick-borne diseases 1, 145-147.
- Pluta, S., Tewald, F., Hartelt, K., Oehme, R., Kimmig, P., Mackenstedt, U., 2009. *Rickettsia slovaca* in *Dermacentor marginatus* ticks, Germany. Emerging infectious diseases 15, 2077-2078.
- Podaliri Vulpiani, M., Iannetti, L., Paganico, D., Iannino, F., Ferri, N., 2011. Methods of Control of the *Leishmania infantum* Dog Reservoir: State of the Art. Veterinary medicine international 2011, 215964.
- Rand, P.W., Smith, R.P., Jr., Lacombe, E.H., 1991. Canine seroprevalence and the distribution of *Ixodes dammini* in an area of emerging Lyme disease. American journal of public health 81, 1331-1334.
- Raoult, D., Roux, V., 1997. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clinical microbiology reviews 10, 694-719.
- Rehacek, J., 1989. Ecological relationships between ticks and *rickettsiae*. European journal of epidemiology 5, 407-413.

- Reif, K.E., Macaluso, K.R., 2009. Ecology of *Rickettsia felis*: a review. Journal of medical entomology 46, 723-736.
- Rieg, S., Schmoldt, S., Theilacker, C., de With, K., Wolfel, S., Kern, W.V., Dobler, G., 2011. Tick-borne lymphadenopathy (TIBOLA) acquired in Southwestern Germany. BMC infectious diseases 11, 167.
- Rikihisa, Y., 1991. The tribe *Ehrlichieae* and ehrlichial diseases. Clinical microbiology reviews 4, 286-308.
- Roux, V., Raoult, D., 2000. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB). International journal of systematic and evolutionary microbiology 50 Pt 4, 1449-1455.
- Rubel, F., Brugger, K., Monazahian, M., Habedank, B., Dautel, H., Leverenz, S., Kahl, O., 2014. The first German map of georeferenced ixodid tick locations. Parasites & vectors 7, 477.
- Rufli, T., Mumcuoglu, Y., 1981. [Ixodidae, hard ticks. Argasidae, soft ticks (author's transl)]. Schweizerische Rundschau für Medizin Praxis = Revue suisse de médecine Praxis 70, 362-385.
- Schex, S., Dobler, G., Riehm, J., Müller, J., Essbauer, S., 2011. *Rickettsia* spp. in wild small mammals in Lower Bavaria, South-Eastern Germany. Vector borne and zoonotic diseases 11, 493-502.
- Schicht, S., Schnieder, T., Strube, C., 2012. *Rickettsia* spp. and coinfections with other pathogenic microorganisms in hard ticks from northern Germany. Journal of medical entomology 49, 766-771.
- Schmatz, H.D., Schmatz, S., Krauss, H., Weber, A., Brunner, H., 1977. Seroepidemiologische Untersuchungen zur Prävalenz von Rickettsien-Antikörpern beim Menschen in der Bundesrepublik Deutschland. Immun Infekt 5, 163-166.
- Schorn, S., Pfister, K., Reulen, H., Mahling, M., Silaghi, C., 2011. Occurrence of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. Parasites & vectors 4, 135.

Schreiber, C., Krucken, J., Beck, S., Maaz, D., Pachnicke, S., Krieger, K., Gross, M., Kohn, B., von Samson-Himmelstjerna, G., 2014. Pathogens in ticks collected from dogs in Berlin/Brandenburg, Germany. *Parasites & vectors* 7, 535.

Schriefer, M.E., Sacci, J.B., Jr., Dumler, J.S., Bullen, M.G., Azad, A.F., 1994. Identification of a novel rickettsial infection in a patient diagnosed with murine typhus. *Journal of clinical microbiology* 32, 949-954.

Segura-Porta, F., Diestre-Ortin, G., Ortuno-Romero, A., Sanfeliu-Sala, I., Font-Creus, B., Munoz-Espin, T., de Antonio, E.M., Casal-Fabrega, J., 1998. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in human beings and dogs from an endemic area of mediterranean spotted fever in Catalonia, Spain. *European journal of epidemiology* 14, 395-398.

Segura, F., Pons, I., Miret, J., Pla, J., Ortuno, A., Nogueras, M.M., 2014. The role of cats in the eco-epidemiology of spotted fever group diseases. *Parasites & vectors* 7, 353.

Shaw, S.E., Day, M.J., Birtles, R.J., Breitschwerdt, E.B., 2001. Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends in parasitology* 17, 74-80.

Silaghi, C., Gilles, J., Höhle, M., Pradel, I., Just, F.T., Fingerle, V., Kuchenhoff, H., Pfister, K., 2008. Prevalence of spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in southern Germany. *Journal of medical entomology* 45, 948-955.

Silaghi, C., Hamel, D., Thiel, C., Pfister, K., Pfeffer, M., 2011. Spotted fever group rickettsiae in ticks, Germany. *Emerging infectious diseases* 17, 890-892.

Simser, J.A., Palmer, A.T., Fingerle, V., Wilske, B., Kurtti, T.J., Munderloh, U.G., 2002. *Rickettsia monacensis* sp. nov., a spotted fever group Rickettsia, from ticks (*Ixodes ricinus*) collected in a European city park. *Applied and environmental microbiology* 68, 4559-4566.

Socolovschi, C., Mediannikov, O., Raoult, D., Parola, P., 2009. The relationship between spotted fever group Rickettsiae and ixodid ticks. *Veterinary research* 40, 34.

Solano-Gallego, L., Kidd, L., Trotta, M., Di Marco, M., Caldin, M., Furlanello,

T., Breitschwerdt, E., 2006a. Febrile illness associated with *Rickettsia conorii* infection in dogs from Sicily. *Emerging infectious diseases* 12, 1985-1988.

Solano-Gallego, L., Llull, J., Osso, M., Hegarty, B., Breitschwerdt, E., 2006b. A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. *Veterinary research* 37, 231-244.

Sonnleitner, S.T., Simeoni, J., Lang, S., Dobler, G., Speck, S., Zelger, R., Schennach, H., Lass-Florl, C., Walder, G., 2013. Spotted fever group--Rickettsiae in the Tyrols: evidence by seroepidemiology and PCR. *Zoonoses and public health* 60, 284-290.

Speck, S., Perseke, L., Petney, T., Skuballa, J., Pfaffle, M., Taraschewski, H., Bunnell, T., Essbauer, S., Dobler, G., 2013. Detection of *Rickettsia helvetica* in ticks collected from European hedgehogs (*Erinaceus europaeus*, Linnaeus, 1758). *Ticks and tick-borne diseases* 4, 222-226.

Sprong, H., Wielinga, P.R., Fonville, M., Reusken, C., Brandenburg, A.H., Borgsteede, F., Gaasenbeek, C., van der Giessen, J.W., 2009. *Ixodes ricinus* ticks are reservoir hosts for *Rickettsia helvetica* and potentially carry flea-borne *Rickettsia* species. *Parasites & vectors* 2, 41.

Switaj, K., Chmielewski, T., Borkowski, P., Tylewska-Wierzbanowska, S., Olszynska-Krowicka, M., 2012. Spotted fever rickettsiosis caused by *Rickettsia raoultii*--case report. *Przegląd epidemiologiczny* 66, 347-350.

Tappe, J., Strube, C., 2013. *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. infections in hard ticks (*Ixodes ricinus*) in the city of Hanover (Germany): revisited. *Ticks and tick-borne diseases* 4, 432-438.

Tesouro, M.A., Bacellar, F., Sainz, A., Filipe, A., 1998. Persistence of antibodies to *Rickettsia conorii* in dogs. *Annals of the New York Academy of Sciences* 849, 441-443.

Torina, A., Alongi, A., Naranjo, V., Scimeca, S., Nicosia, S., Di Marco, V., Caracappa, S., Kocan, K.M., de la Fuente, J., 2008. Characterization of *anaplasma* infections in Sicily, Italy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1149, 90-93.

Vitale, G., Mansuelo, S., Rolain, J.M., Raoult, D., 2006. *Rickettsia massiliae* human isolation. Emerging infectious diseases 12, 174-175.

Vitorino, L., Chelo, I.M., Bacellar, F., Ze-Ze, L., 2007. *Rickettsiae* phylogeny: a multigenic approach. Microbiology 153, 160-168.

Walker, D.H., 2007. *Rickettsiae* and rickettsial infections: the current state of knowledge. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 45 Suppl 1, S39-44.

Walker, D.H., Ismail, N., 2008. Emerging and re-emerging rickettsioses: endothelial cell infection and early disease events. Nature reviews. Microbiology 6, 375-386.

Walker, D.H., Valbuena, G.A., Olano, J.P., 2003. Pathogenic mechanisms of diseases caused by *Rickettsia*. Annals of the New York Academy of Sciences 990, 1-11.

Williams, M., Izzard, L., Graves, S.R., Stenos, J., Kelly, J.J., 2011. First probable Australian cases of human infection with *Rickettsia felis* (cat-flea typhus). The Medical journal of Australia 194, 41-43.

Wölfel, R., Terzioglu, R., Kiessling, J., Wilhelm, S., Essbauer, S., Pfeffer, M., Dobler, G., 2006. *Rickettsia* spp. in *Ixodes ricinus* ticks in Bavaria, Germany. Annals of the New York Academy of Sciences 1078, 509-511.

Wölfel, S., Mertens, M., Speck, S., Essbauer, S., Ulrich, R.G., Wölfel, R., Dobler, G. unpublished. Seroprevalence of IgG against *Rickettsiae* of the Spotted Fever Group in Forestry Workers in State Brandenburg, Eastern Germany.

X. ABBILDUNGEN

- Abb. 1: Systematik der Ordnung Rickettsiales
- Abb. 2: Übertragungswege der Rickettsien innerhalb der Zecken und von einem Wirt
- Abb. 3: Diagnostische Möglichkeiten bei Rickettsiosen
[Quelle: (Brouqui et al., 2004), modifiziert]
- Abb. 4: Prinzip des Immunfluoreszenztest
- Abb. 5: Geographische Einteilung Deutschlands in fünf Regionen
- Abb. 6: Auftrennung des Vollbluts in einer Mikrokapillare nach Zentrifugation
- Abb. 7: ELISA-Titerplatte kurz vor der Auswertung im ELISA-Reader
- Abb. 8: Slide flask (Quelle: www.sarstedt.com, 06.02.2015)
- Abb. 9: Objektträger mit fünf verschiedenen Antigenen auf einem Feld
- Abb. 10: Aufruf zur Probensammlung (Deutsches Tierärzteblatt, 06/2013, S.762)
- Abb. 11: Fragebogen

XI. TABELLEN

- Tab. 1: Spotted Fever Group Rickettsiae in Deutschland - Prävalenzzahlen in Zecken in Abhängigkeit der geographischen Lage
- Tab. 2: Spotted Fever Group Rickettsiae: Überblick Seroprävalenzen bei Mensch und Tier – Beispiele
- Tab. 3: Anzucht der in dieser Studie verwendeten Rickettsien in Zellkultur: verwendetet Stämme, Zelllinien, Anzuchtzeit und -temperatur
- Tab. 4: Aufteilung Probenmaterial von Hunden in Deutschland nach den verschiedenen Kriterien
- Tab. 5: Verwendete Geräte
- Tab. 6: Verwendete Kits und Chemikalien
- Tab. 7: Verwendete Puffer, Lösungen
- Tab. 8: Verwendete Antikörper, Kontrollseren

XII. ANHANG

1. Material

1.1. Geräte

Tab. 5: Verwendete Geräte

Gerät	Firma
Leitz Diaplan Lichtmikroskop	(Ernst Leitz Wetzlar, Wetzlar, Deutschland)
Haematokrit 20 Hettich	(Hettich, Bäch, Schweiz)
LEDetect 96	(Labexim, Lengau, Österreich)
Leica 5000	(Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland)
Pipetten	(Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

1.2. Kits, Chemikalien

Tab. 6: Verwendete Kits und Chemikalien

Kits	Firma
Spotted Fever Group Canine IgG ELISA Kit	(Fuller Laboratories, Fullerton, California, USA)
Chemikalien	
Diff Quick®	(Polysciences, Warrington, USA)
Evans Blue	(Sigma-Aldrich® Chemie, München, Deutschland)
FKS	(Biochrom, Berlin, Deutschland)
Formalin	(Sigma-Aldrich® Chemie, München, Deutschland)
Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled rabbit anti-dog immunoglobulin G	(Sigma-Aldrich® Chemie, St. Louis, USA)
Fluorescence mounting medium	(Dako, Carpinteria, California, USA)
Giemsa Lösung	(Sigma-Aldrich® Chemie, München, Deutschland)
Insectomed express	(Biochrom, Berlin, Deutschland)
MEM	(Sigma-Aldrich® Chemie, München, Deutschland)
Methanol	(Sigma-Aldrich® Chemie, München, Deutschland)
NEAA	(Sigma-Aldrich® Chemie, München, Deutschland)
PBS	(Sigma-Aldrich® Chemie, München, Deutschland)
Tween	(Euroimmun, Lübeck, Deutschland)

1.3. Puffer, Lösungen

Tab. 7: Verwendete Puffer, Lösungen

Puffer	Firma
Sample Diluent ELISA (PBS Puffer mit Serum Albumin und Tween 30)	(Fuller Laboratories, Fullerton, California, USA)
Lösungen	
TMB Substrat [H ₂ O ₂ und Tetramethylbenzidin (TMB)]	(Fuller Laboratories, Fullerton, California, USA)
Stop Lösung (Schwefelsäure, verdünnt)	(Fuller Laboratories, Fullerton, California, USA)

1.4. Antikörper, Kontrollseren

Tab. 8: Verwendete Antikörper, Kontrollseren

Antikörper		Firma
Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled rabbit anti-dog immunoglobulin G		(Sigma-Aldrich® Chemie, St. Louis, USA)
IgG HRP Conjugate (Affinity-purified peroxidase-labeled goat anti-canine IgG)		(Fuller Laboratories, Fullerton, California, USA)
Kontrollseren		Firma
Positivkontrolle ELISA (Canine serum reactive with SFG Rickettsiae, Verdünnung 1:10)		(Fuller Laboratories, Fullerton, California, USA)
Cutoff Calibrator ELISA (Canine serum equivocally reactive with SFG Rickettsiae, Verdünnung 1:10)		(Fuller Laboratories, Fullerton, California, USA)
Negativkontrolle ELISA (Canine serum non-reactive with SFG Rickettsiae, Verdünnung 1:10)		(Fuller Laboratories, Fullerton, California, USA)

2. Dokumente

Studie zum „Vorkommen von Rickettsien-Infektionen beim Hund in Deutschland“

Rickettsien der Zeckenbissfiebergruppe (engl. Spotted Fever Group Rickettsiae) sind in Deutschland mittlerweile in Schild- und Auwaldzecken weit verbreitet, mit regional stark variierenden Prävalenzen zwischen ca. 5 und 50 Prozent. Eine Infektion mit Rickettsien kann beim Menschen zu Erkrankungen führen; in Amerika sind schwere Erkrankungen bei Hunden nach Infektion mit *Rickettsia rickettsii* (Rocky Mountain spotted fever) beschrieben, in Südeuropa wurden bei Hunden erhöhte Antikörpertiter mit *Rickettsia conorii* (Mittelmeerfleckfieber) festgestellt, in Deutschland ist über Infektionen mit Rickettsien bei Hunden noch nichts bekannt.

Eine Studie des Lehrstuhls für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der Ludwig-Maximilians-Universität München soll das Vorkommen, die geografische Ausbreitung und die Bedeutung von Rickettsien-Infektionen beim Hund in Deutschland klären. Es werden

Blutproben von Hunden aus ganz Deutschland mittels ELISA auf Rickettsien-Antikörper gescreent, evtl. auf den Hunden parasitierende Zecken werden molekularbiologisch mittels PCR untersucht.

Unterstützen Sie die Studie! Steht bei Hunden, die Deutschland zeitlebens nicht verlassen haben, eine Blutentnahme an, lassen Sie uns einen Teil des Serums und EDTA-Blutes inkl. Blutausstrich mit einem ausgefüllten Fragebogen zukommen. Falls Sie als Praktiker oder Tierklinik Interesse an einer Teilnahme haben, finden Sie **nähere Informationen** zur Studie und dem benötigten Probenmaterial unter www.tropa.vetmed.uni-muenchen.de. **Kontakt:** TÄ Miriam Wächter (Doktorandin), PD Dr. Cornelia Silaghi, Lehrstuhl für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie, Leopoldstr. 5, 80802 München, Tel. (089) 21 80-28 16, Miriam.Waechter@tropa.vetmed.uni-muenchen.de
Vielen Dank für ihre Mithilfe!

Abb. 10: Aufruf zur Probensammlung (Deutsches Tierärzteblatt, 06/2013, S.762)

Begleitbogen zur Studie
„Vorkommen von Rickettsien-Infektionen beim Hund in Deutschland“

Datum der Blutentnahme			
Spezies	Hund		
Rasse (bei Mischlingen Felllänge,-farbe)			
Geschlecht			
Alter			
Herkunft (Geburtsort)			
momentaner Wohnort	PLZ, Stadt: <input type="checkbox"/> ländlich <input type="checkbox"/> städtisch <input type="checkbox"/> unbekannt		
Haltung, Spaziergewohnheiten (einzeln, mehrere Hunde)			
Angewendete Zeckenprophylaxe (welches Mittel, wie oft)			
Nutzung (Jagdhund, Rettungshund, Wachhund, Familienhund, Polizeihund)			
Vorstellungsgrund (ggfs Symptome)			
Verdachtsdiagnose			

Probennummer (laut beiliegenden Aufklebern)	Einsendende Tierarztpraxis

Abb. 11: Fragebogen

XIII. DANKSAGUNG

Als erstes möchte ich mich bei PD Dr. Cornelia Silaghi bedanken. Sie hat mir die Möglichkeit gegeben, über dieses sehr interessante Thema zu promovieren. Außerdem war Sie die beste Betreuerin, die ich mir vorstellen konnte. Ich möchte mich bedanken für die immer zeitnahe, sehr konstruktive Kritik, die Unterstützung bei allen organisatorischen Dingen, die aufbauenden Worte bei meiner Fachtagung und und und...VIELEN, VIELEN DANK FÜR ALLES!!!

Gleich danach möchte ich mich bei meinem zweiten Betreuer Prof. Martin Pfeffer bedanken! Auch hier fand ich immer ein offenes Ohr, falls es mal Probleme gab und zusammen haben wir immer eine Lösung gefunden. DANKE!!

Ein ganz besonderer Dank gilt auch dem Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, an dem ich einen Teil meiner Arbeiten anfertigen durfte. Hier besonders Dr. Gerhard Dobler, der mit gleicher Spannung wie ich das Fortschreiten des Projekts unterstützt hat und Dr. Silke Wölfel, die unermüdlich mit mir dagesessen ist und mich immens in meinen Labor- und Mikroskopierarbeiten unterstützt hat, außerdem ist sie ein ganz wundervoller Mensch. DANKE!!

Dem ganzen Laborteam vom Lehrstuhl der Vergleichenden Tropenmedizin und Parasitologie, allen voran Andrea Mihalcov und Ute Maurer, die mich in die Techniken des Mikroskopierens und des ELISA eingeführt haben und mich bei der Probenbearbeitung mit unendlicher Geduld unterstützt haben. DANKE!!

Natürlich allen fleißigen Probensammlern: Prof. Dr. Ingo Nolte und Jan-Peter Bach, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover; Nicole Schulz und Prof. Andreas Moritz, Klinik für Kleintiere, Justus-Liebig-Universität Gießen; Anneliese Balling, Institut für Tierhygiene, Universität Leipzig; Aleksandra Chirek, Kleintierklinik der Freien Universität Berlin; Dr. Sabine Schall, Schifferstadt; Elisabeth Stemmler, Hohenwestedt, Tierklinik Dr. Stefan Reindl, Ingolstadt, Tierarztpraxis Dr. Ebenboeck und Kollegen, Traunstein, Dr. Uwe Urban, Amerang, Anuschka Winkelmann, St. Wolfgang, Johanna Gude, Eckental, Dr. Martin Steffl, Universität Hohenheim, Stuttgart, Dr. Armin Reinle, Weil am Rhein, Tierklinik Neckarwiesen, Esslingen, Femke Mortier, Medizinische Kleintierklinik, LMU München. Ohne sie wäre dieses Projekt niemals möglich

gewesen. DANKE!!

Bei Dr. Michael Leschnik, Veterinärmedizinische Universität Wien, Österreich für das Bereitstellen der Positivkontrollen. DANKE!!

Außerdem möchte ich mich bei meinen Mitdoktorandinnen Anna, Carina, Alexandra, Franziska und Julia bedanken, denn geteiltes Leid ist halbes Leid! DANKE!!

Meinen Arbeitskollegen in der Tierklinik Dr. Reindl und in der Tierarztpraxis Fellner, die immer Rücksicht auf meine Doktorarbeit genommen haben und mich auch mal abgelenkt haben wenn es gerade nicht so gut lief. DANKE!!

Bei Damaris Neumayer für das Korrekturlesen der englischen Texte und bei Sonja Rank für die Hilfe bei der Einführung in die Statistik. DANKE!!

Außerdem möchte ich mich bei allen meinen Freunden bedanken, die immer Verständnis dafür hatten, wenn ich aufgrund der vielen Arbeit mal nicht so viel Zeit für sie hatte. DANKE!!

Dank gilt außerdem der Firma Bayer Health Care für die Gewährung des Stipendiums, ansonsten hätte ich nicht die Zeit für dieses anspruchsvolle Projekt aufbringen können. DANKE!!

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, bei meiner Mutter Elisabeth und meinem Vater Werner, die mich immer in meinem Weg bestärkt haben und sich über jeden noch so kleinen Fortschritt mit mir gefreut haben. Meine Schwester Kristine für ihre aufmunternden Worte und natürlich und ganz besonders bei meinem Freund Marcel der immer meine Launen, meine „ich hab jetzt keine Zeit für dich ich muss schreiben“ mit mir durchmachen musste und mir immer den Rücken gestärkt hat! DANKE!!